

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1949

N° 616

THÈSE
POUR LE
DOCTORAT EN MÉDECINE
(Diplôme d'État)

PAR

Jacques Albert MAURIN

Né le 16 Février 1921, à Oran

Présentée et soutenue publiquement le 28 Juin 1949

Adaptation de la Technique
de Cultures de Tissus
à l'Étude des Virus

Président : M. P. MOLLARET, Professeur

J. PEYRONNET & Cie, ÉDITEURS
33, Rue Vivienne, PARIS-2°

1950

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1949

N° 616

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Jacques Albert MAURIN

Né le 16 Février 1921, à Oran

Présentée et soutenue publiquement le 28 Juin 1949

Adaptation de la Technique de Cultures de Tissus à l'Étude des Virus

Président : M. P. MOLLARET, Professeur

J. PEYRONNET & Cie, ÉDITEURS

33, Rue Vivienne, PARIS-2°

1950



FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Nom du Candidat : *Maurin*

Prénoms : *Jacques Albert*

Date de la soutenance : *28 Juin 1949*

Numéro d'ordre : *616*

1

MAURIN (Jacques Albert). — Adaptation de la Technique de Cultures de Tissus à l'Etude des Virus. — Paris, J. Peyronnet et C^{ie}, Editeurs, 1950, in-8°, 104 pages.

(Th. méd. (Et.), Paris, 1949, N° 616.)

2

MAURIN (Jacques Albert). — Adaptation de la Technique de Cultures de Tissus à l'Etude des Virus. — Paris, J. Peyronnet et C^{ie}, Editeurs, 1950, in-8°, 104 pages.

(Th. méd. (Et.), Paris, 1949, N° 616.)

3

MAURIN (Jacques Albert). — Adaptation de la Technique de Cultures de Tissus à l'Etude des Virus. — Paris, J. Peyronnet et C^{ie}, Editeurs, 1950, in-8°, 104 pages.

(Th. méd. (Et.), Paris, 1949, N° 616.)

4

MAURIN (Jacques Albert). — Adaptation de la Technique de Cultures de Tissus à l'Etude des Virus. — Paris, J. Peyronnet et C^{ie}, Editeurs, 1950, in-8°, 104 pages.

(Th. méd. (Et.), Paris, 1949, N° 616.)

DOYENS HONORAIRES :

MM. BALTHAZARD, BAUDOUIN

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. AUBERTIN, BALTHAZARD, BASSET, BAUDOUIN, BRINDEAU, E. BRUMPT, CARNOT, CHEVASSU, CHIRAY, CLERC, DELBET, GUILLAIN, HARTMANN, HEITZ-BOYER, LAIGNEL-LAVASTINE, LAUBRY, LEMIERRE, LHERMITTE, LOEPER, MARION, MATHIEU, MULON, OMBREDANNE, ROUVIERE, SANNIE, SEBILEAU, SEZARY, TANON.

DOYEN	Léon BINET
	<i>Membre de l'Institut</i>
ASSESSEUR	Jean VERNE

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	OLIVIER E.
Anatomie pathologique	LEROUX R.
Assistance médico-sociale	N...
Bactériologie	GASTINEL P.
Biologie médicale	VERNE J.
Chimie médicale	POLONOVSKI M.
Clinique de cardiologie	DONZELOT E.
	BROCQ P.
Cliniques chirurgicales	CADENAT F. M.
	MONDOR H.
	QUÉNU J.
	N...
Clinique chirurgicale infantile et d'orthopédie	MERLE D'AUBIGNÉ R.
Chirurgie chirurgicale orthopédique	MOCQUOT P.
Clinique gynécologique	GOUGEROT H.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	DEBRÉ R.
Clinique des maladies des enfants	MOLLAIET P.
Clinique des maladies infectieuses	DELAY J.
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale	CHEVALIER P.
Clinique des maladies du sang	ALAJOUANINE T.
Clinique des maladies du système nerveux	BÉNARD H.
	LAROCHE G.
Cliniques médicales	HARVIER P.
	LIAN C.
Clinique médicale propédeutique	PASTEUR VALLERY-RADOT L.
Clinique de Neuro-chirurgie	PETIT-DUTAILLIS D.
	LANTUÉJOUL P.
Cliniques obstétricales	LÉVY-SOLAL E.
	PORTES L.
Clinique ophtalmologique	VELTER E.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE F.
Clinique physio-pathologique des problèmes alimentaires (chaire à titre personnel)	RICHET C.
Clinique psychiatrique infantile	HEUYER C.

	MM.
Clinique de puériculture	LELONG M.
Clinique stomatologique	DECHAUME M.
Clinique thérapeutique chirurgicale	SÈNEQUE J.
Clinique thérapeutique médicale	CHABROL E.
Clinique de la Tuberculose	BERNARD E.
Clinique urologique	FEY B.
Embryologie	GIROUD A.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	BARIÉTY M.
Histologie	CHAMPY C.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	JUSTIN-BESANÇON L.
Hygiène et clinique de la première enfance	CATHALA J.
Hygiène et médecine préventive	JOANNON G.
Médecine du Travail	DESOILLE H.
Médecine légale	PIÉDELIEVRE R.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	GALLIARD H.
Pathologie chirurgicale	DE GAUDART D'ALLAINES F.
Pathologie exotique	LAVIER G.
Pathologie expérimentale et comparée	LEMAIRE A.
Pathologie médicale	MOREAU R.
Pathologie et thérapeutique générales	DE GENNES L.
Pharmacologie et matière médicale	HAZARD R.
Physiologie	BINET L.
Physique médicale	STROHL A.
Radiologie médicale	DESGREZ H.
Rhumatologie	COSTE F.
Technique chirurgicale	MOULONGUET P.
Thérapeutique	TURPIN R.

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

BULLIARD (Histologie), CORDIER (Anatomie), DOGNON (Physique médicale), HALPHEN (O. R. L.), JAYLE M. (Chimie médicale), Mlle J. LEVY (Pharmacologie).

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

Anatomie	N...
	DELMAS.
	N... ff. DEBEYRE.
Anatomie pathologique	DELARUE.
	Mlle GAUTHIER-VILLARS.
Bactériologie	BONNET.
	FASQUELLE.
Biochimie médicale	ETTORI.
	SCHAPIRA.
Dermato-Syphiligraphie	DEGOS.
	COUJARD.
Histologie	DESCLAUX.
	DEBRAY.
Hydrologie	BOYER.
	DEPARIS.
Hygiène	DEROBERT.
	PUECH.
Médecine légale	DE SEZE.
Neurochirurgie	DIGONNET.
	MAYER.
Neurologie	SUREAU.
	VARANGOT.
Obstétrique	

	MM.
Ophtalmologie	OFFRET.
Oto-rhino-laryngologie	AUBIN.
Parasitologie	BRUMPT L. C.
	FEVRE.
	HUGUIER.
	LEGER.
	PADOVANI.
Pathologie chirurgicale	PATEL.
	ROUX.
	RUDLER.
	SICARD.
	N...
Pathologie expérimentale	MERKLEN.
	BROUET.
	CACHERA.
	DECOURT.
	DREYFUS Gilbert.
	FAUVERT.
	GARCIN.
Pathologie médicale	HAMBURGER.
	KOURILSKY.
	LAMY.
	LENÈGRE.
	MARCHAL.
	MAURIC.
	SOULIÉ.
Pédiatrie	LAPLANE.
Pharmacologie	MARIE Julien.
Physiologie	CHEYMOL.
	BARGETON.
Physique médicale.....	PARROT.
Psychiatrie	DJOURNO.
Thérapeutique Agr. ch. d'ens.	BARUK.
Urologie	BROUET.
	COUVELAIRE R.

III. — PROFESSEURS HONORAIRES et AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE pour le service des examens

MM. BASSET (Pathologie chirurgicale), BRINDEAU (Obstétrique),
GATELLIER (Clinique chirurgicale), HUGUENIN (Anatomie pathologique),
LE LORIER (Obstétrique), VAUDESCAL (Obstétrique).

IV. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent

	MM.
Clinique chirurgicale	AMELINE.
	FUNCK-BRENTANO.
	MÉNEGAUX.

MM.

Clinique médicale	{	BOULIN.
Clinique obstétricale		HAGUENAU.
Clinique ophtalmologique		MOUQUIN.
		ECALLE.
		LACOMME.
		RENARD.

MM.

Secrétaire de la Faculté	J. MOREL.
Secrétaire-adjoint	Mlle CHAINTREUIL.

Bibliothécaire en Chef	Docteur A. HAHN.
Bibliothécaires	Mlles DUMAITRE, GOICHON, LAURENT.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON PERE

Mon meilleur Maître

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur P. MOLLARET
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris
Médecin de l'hôpital Claude-Bernard
Chef de Service à l'Institut Pasteur

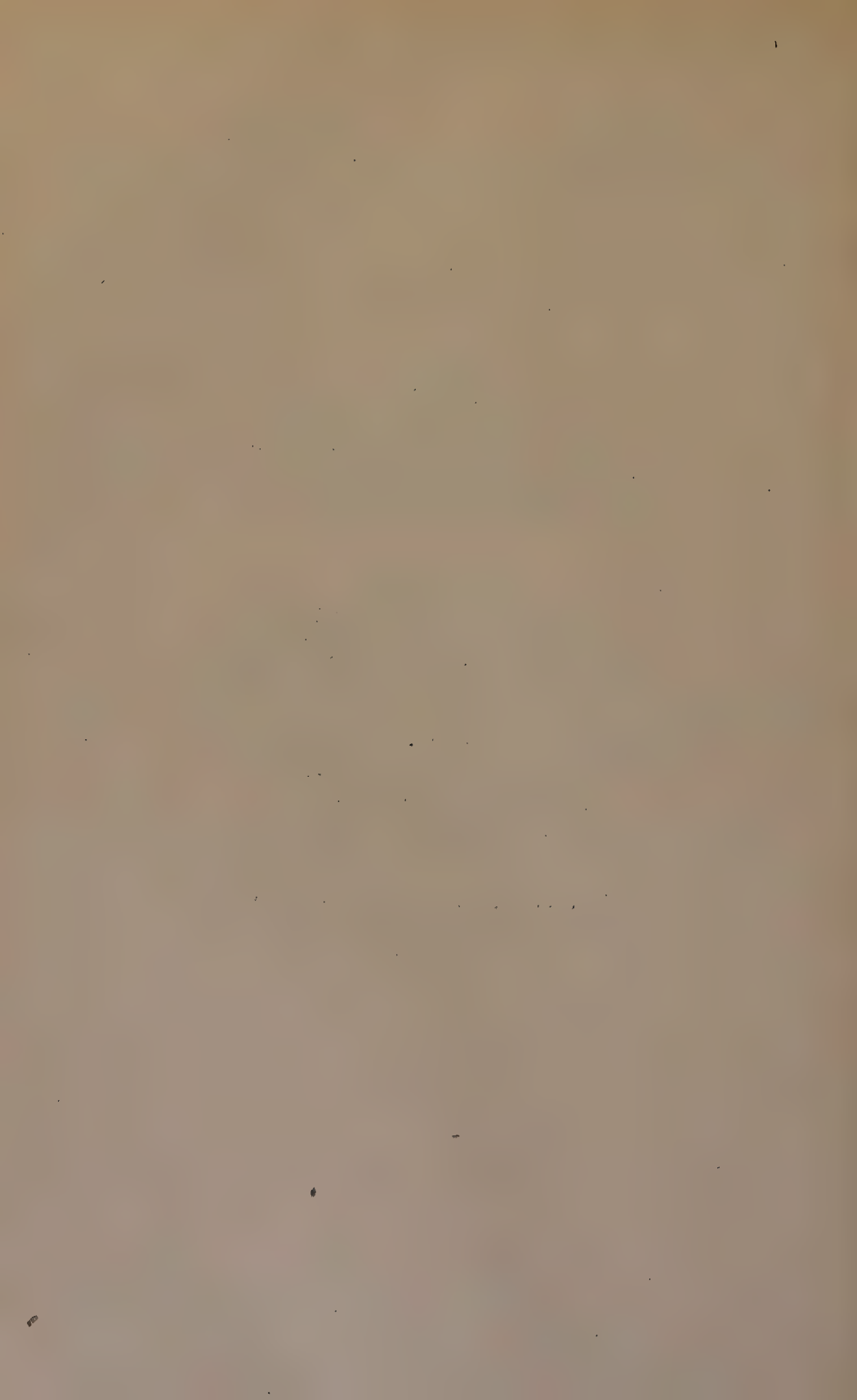
A MON MAÎTRE

Monsieur le Professeur P. LÉPINE
Chef du service des Virus à l'Institut Pasteur
Professeur à l'Université de Montréal

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. TREFOUEL

Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Institut
Membre de l'Académie de Médecine

A MES MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX



Introduction

La question des cultures de virus en cultures de tissus a été l'objet de très nombreuses recherches, et malgré cela, encore actuellement, les travaux publiés soutiennent des opinions diverses et parfois contradictoires. Il est certain que l'absence de visibilité de la plupart des virus à l'aide de la microscopie en lumière blanche et le fait qu'il a été impossible jusqu'à ce jour de les cultiver en dehors de la cellule vivante, augmentent par là les difficultés de leur étude.

C'est pourquoi nous ne saurions envisager ici de présenter ou de résumer tous les travaux qui ont trait à l'étude des virus en culture de tissus.

Par « culture de tissus » nous entendons l'explantation en dehors d'un organisme de fragments d'organes vivants, que l'on place in vitro dans un milieu nutritif capable d'assurer la survie et la prolifération des cellules. C'est pourquoi les cultures dans l'œuf de poule en incubation n'entrent pas dans le cadre de notre sujet; l'embryon de poulet dans l'œuf est un organisme entier, avec son système circulatoire, son système neuro-végétatif, son immunologie propre.

La culture des virus in ovo n'est donc qu'un cas particulier de l'étude des virus dans les organismes vivants, et se sépare nettement de l'étude en culture de tissus proprement dite.

Sans entrer dans le détail des problèmes théoriques non encore résolus que pose la culture des virus in vitro, tel celui de la variation des virus en culture, nous étudierons les principales applications permises par cette technique. Après un exposé des différentes méthodes de culture, nous insistons plus particulièrement sur le comportement des virus en cultures de tissus et les lésions histologiques qu'il provoque, les études ayant trait à l'immunologie, l'étude des interférences entre les différents virus, l'utilisation des cultures de tissus au cours de l'isolement et du titrage des virus, la production de souches utilisables dans la pratique pour les vaccinations humaines ou animales, l'application à la recherche des effets des substances chimiques et biologiques, et enfin les caractéristiques

tères propres à la culture des virus végétaux en culture de tissus.

Sans vouloir anticiper sur les conclusions auxquelles nous avons abouti, il nous paraît cependant indispensable, avant d'aborder le détail de notre travail, de préciser qu'il faut toujours avoir présent à l'esprit que, quels que soient les faits observés, ils sont propres à certains virus et ne sauraient sans contrôle être l'objet de généralisations, tant le domaine des maladies à virus s'est étendu durant ces dernières années, et leur diversité de comportement est apparue manifeste.

CHAPITRE PREMIER

Exposé général des Techniques de Culture

Pour cultiver les virus, il est possible actuellement de faire appel à un grand nombre de méthodes de culture de tissus. Les unes sont les cultures cellulaires classiques, les plus anciennes, utilisant comme support, à la suite des travaux de Harrison, de Burrows et de Carrel (70) (71) (24) (25) (28) (29) (30), le plasma coagulé : méthode de la goutte pendante, des flacons de Carrel, etc. Peuvent également être considérées comme classiques l'ensemble des techniques réunies sous le nom de méthode de Maitland. Celle-ci ne constitue pas une véritable culture de tissus au sens strict du terme, mais plutôt une simple suspension de cellules en survie. Elle entre cependant dans le cadre de notre description; elle permet en effet une croissance cellulaire dans certaines conditions et son importance dans la culture des virus *in vitro* est très grande. Les autres méthodes sont plus modernes; elles ont vu le jour depuis une dizaine d'années et sont spécialement adaptées à la culture des virus. Ce sont principalement les méthodes de culture :

- en tubes roulants;
- sur gélose-tissu;
- sur membranes plastiques.

Nous envisagerons donc successivement les méthodes classiques, puis les méthodes modernes : origine, description rapide et principaux emplois de chacune d'entre elles.

Nous insisterons davantage sur la méthode des membranes plastiques, mise au point dans le service des virus de l'Institut Pasteur.

METHODES CLASSIQUES

Méthodes de culture de tissus en plasma.

C'est tout naturellement la technique primitive de culture de tissus en plasma coagulé mise au point par Carrel qui a été utilisée en premier lieu en France par C. Levaditi (1913) (89) (90) (91) et en même temps en Amérique par E. Steinhardt, Israeli et Lambert (1913) (156).

La méthode de la goutte pendante, très connue, consiste à mélanger sur une lamelle couvre-objet une ou plusieurs gouttes de plasma avec une même quantité d'extrait embryonnaire et généralement la même quantité de solution physiologique (Tyrode). Avant que le mélange ne soit coagulé on introduit un fragment d'organe. Puis on pose la lamelle sur une lame creusée spécialement, la goutte de plasma coagulé et son fragment « pendant » à l'intérieur de la cavité close ainsi réalisée, et l'on scelle à la paraffine. Les cultures sont misés à l'étuve à 37°. Les repiquages se font tous les 2 ou 3 jours, lorsque le plasma commence à se liquéfier. On ouvre la culture; le fragment est séparé du caillot à l'aide d'instruments fins, lavé dans une solution physiologique, et remis en culture comme la première fois, dans du plasma et de l'extrait frais.

Il est facile d'introduire le virus en laissant au contact pendant quelque temps (de 10 minutes à 1 heure en général), avant la mise en culture, les fragments plongés dans une suspension de virus. Carrel (1928) (27) a conseillé le séjour en glacière de ce mélange pour faciliter la pénétration du virus dans les cellules. Cette pratique, qui reposait sur des conceptions dont l'usage a révélé l'inexactitude [Andrewes 1929 (3), Sabin 1935 (136)] est actuellement abandonnée.

Maximow a apporté une modification qui simplifie les manipulations après la mise en culture (107).

Les gouttes de plasma coagulé contenant les fragments d'organes sont placées sur une petite lamelle ronde qui, elle-même, adhère par capillarité à une lamelle carrée de plus grandes dimensions. C'est cette lamelle carrée qui est scellée sur la lame creuse. Cette disposition permet de détacher stérilement la petite lamelle, de laver les cultures dans une solution physiologique, puis de les arroser d'extrait embryonnaire frais, pour replacer le tout sur une nouvelle lame carrée qu'on remet en place comme la première. Cette opération de renouvellement du milieu s'opère tous les 4 ou 5 jours et permet des cultures d'une certaine durée sans repiquage.

De même, l'utilisation des flacons de Carrel simplifie l'« entretien » du milieu.

La culture se fait en deux phases, une inférieure plasmatique, contenant les fragments d'organes, surmontée d'une autre, liquide, renouvelable à volonté. On obtient ainsi des quantités de tissus et de virus beaucoup plus considérables sans avoir à effectuer de repiquages.

D'autres méthodes de culture en plasma, créées pour des besoins particuliers, ont pu être employées pour l'étude des virus.

Citons celle de Borrel (20) dans laquelle la croissance s'effectue entre un caillot plasmatique et le fond amovible d'un flacon de verre, semblable par ailleurs aux flacons de Carrel. On obtient ainsi un étalement cellulaire meilleur, facilitant les observations cytologiques.

La complexité relative des méthodes de culture en plasma a orienté depuis longtemps les chercheurs vers la mise au point d'une technique plus simple, qui réduise au minimum les manipulations, mais permette cependant la production du virus en abondance suffisante.

Méthode de Maitland.

En 1928, H. B. et M. C. Maitland (103) ont décrit une technique de culture du virus vaccinal en milieu liquide, en présence de cellules en état de prolifération résiduelle. En voici l'essentiel :

Du sérum de poule est préparé par coagulation du sang. Les reins du même animal sont prélevés aseptiquement et finement découpés avec des ciseaux. 0,66 cm³ du produit obtenu sont mélangés à 1,33 cm³ de suspension de virus vaccinal préalablement diluée (1 partie pour 6,6 de solution de Tyrode). On a donc maintenant une dilution de virus de 1/10. Puis 12 cm³ de Tyrode et 6 cm³ de sérum de poule sont ajoutés au mélange virus-fragment d'organes, ce qui donne une dilution finale de 1/100. Distribuées par 2 cm³ en flacons de Carrel du type D, les cultures sont mises à l'étuve à 37° sans capuchon. Après 5 jours d'incubation, le liquide surnageant est prélevé et introduit dans une nouvelle culture.

Par ce procédé, H. B. et M. C. Maitland ont obtenu une importante prolifération du virus vaccinal : 25 × 10⁶ fois en 4 cultures.

La simplicité de cette technique et les bons résultats obtenus ont conduit une foule d'auteurs à s'en inspirer. Par des réalisations analogues la plupart des virus ont pu être cultivés. On réunit actuellement sous le nom de méthode de Maitland l'ensemble de ces techniques, qui ont toutes pour point commun, outre le repiquage du virus par transmission de quelques gouttes de liquide de

culture dans un milieu neuf tous les 2 ou 3 jours, la présence des quatre composants indispensables :

- Fragments de tissus,
- Tyrode,
- Sérum,
- Virus,

qui peuvent différer dans leur origine et leurs proportions. Toutes sortes de tissus peuvent être utilisés, suivant les affinités du virus étudié. Nous n'entrerons pas dans le détail des discussions sur l'influence du pH, la température de culture optimum, etc., ces facteurs variant avec les tissus et les virus cultivés.

Parmi les quatre constituants, le sérum joue un rôle particulier : la complexité de sa composition est une source d'incertitudes vis-à-vis de son comportement à l'égard du virus. Aussi a-t-on cherché à s'en débarrasser. Dès 1930, Li et Rivers (94) l'ont purement et simplement éliminé. Ces auteurs ont cultivé avec succès le virus vaccinal dans un milieu constituant uniquement en fragments finement découpés d'embryon de poulet entier, en suspension dans du liquide de Tyrode. Malgré sa très grande simplicité, ce milieu a pu servir à la culture d'un grand nombre de virus.

Cependant, dans beaucoup de cas il apparaît insuffisant ou même toxique. Aussi, à la suite des travaux de Simms et Stillmann [Simms (1936) (148), Simms et Stillmann (1937) (150)] et de Simms et Sanders (1942) (149), de nombreux auteurs [dont Sanders en 1940 (138), Sanders et Jungeblut en 1942 pour la poliomyélite (142)] ont substitué au sérum total le sérum ultrafiltré, qui permet d'obtenir de bien meilleures cultures. Simms et ses collaborateurs considèrent que la cause en est dans le fait que l'ultrafiltration prive le sérum d'un facteur, qu'ils appellent facteur B, responsable de la dégénérescence grasseuse des cellules, mais qu'elle conserve le facteur A stimulateur de la croissance. En fait le sérum est un milieu fort complexe, et il est difficile de déterminer le rôle exact de ses différents constituants. L'expérience prouve en tous cas que l'élimination des plus grosses molécules améliore, pour la culture en milieu de Maitland, la valeur du sérum, qui perd ainsi d'ailleurs sa spécificité d'espèce et sa spécificité sérologique.

La méthode de Maitland-sérum ultrafiltré (méthode de Sanders), de plus en plus employée, apparaît actuellement comme une des meilleures techniques de culture des virus *in vitro*. Elle n'est pas la plus indiquée pour l'étude histologique fine; elle convient bien en revanche pour les recherches immunologiques, l'étude des affinités tissulaires propres à chaque virus, etc. Son indication majeure est la culture étendue des virus. Cependant elle ne peut pas toujours

se substituer aux autres méthodes d'obtention du virus en quantités importantes.

Par exemple, lorsqu'il s'agit d'obtenir des suspensions de corpuscules vaccinaux en grandes quantités, il est plus facile de faire appel à la méthode de Smadel et Wall (151) qui isolent le virus par digestion trypsique et centrifugation différentielle à partir de vaccine cultivé sur la membrane chorio-allantoïque de l'œuf de poule en incubation, ou la méthode de Parker et Rivers (120), qui utilise le produit de râclage de la face dermique de la peau de lapins atteints de vaccine cutanée.

On voit donc que malgré son intérêt théorique considérable, la méthode de Maitland admet des limites à son utilisation pratique. Elle reste néanmoins une des principales, sa qualité dominante étant sa simplicité.

METHODES MODERNES (*)

A côté de ces méthodes classiques, il importe de donner une place importante à des techniques plus récentes, qui ont servi depuis une dizaine d'années à la culture de virus très divers. Les unes, assez générales, ont pu être adaptées à différents buts. D'autres sont plus spécialisées et répondent à des besoins définis. Nous les envisagerons successivement.

Méthode des tubes à rotation axiale ou tubes roulants (roller-tubes).

C'est en 1933 que Gey a décrit, sous le nom de « Roller tube method » (60) une technique nouvelle. L'auteur n'a pas eu connaissance des travaux antérieurs de Carrel (26) et de Löwenstädt (97), qui préconisaient le même principe. Cette méthode permet la culture en masse de tissus divers, spécialement les cellules tumorales. Les avantages en sont :

- la possibilité de maintenir en permanence diverses souches de cellules de types divers;
- l'élimination des repiquages embarrassants et compliqués;
- l'économie de milieu nutritif.

La même méthode est appliquée en 1939 par Gey et Bang (61) à la culture d'un virus, l'agent du lymphogranulome inguinal (maladie de Nicolas-Favre), afin d'étudier la cytopathologie des cellules infectées en vie.

Les cultures s'effectuent dans des tubes de verre pyrex de 16 × 150 mm, dont la paroi interne est recouverte, dans ses 2/3 inférieurs, d'une fine couche de plasma mélangé avant coagulation à du sérum humain provenant du sang du cordon ombilical prélevé à la naissance (**), de l'extrait embryonnaire bovin et une solution physiologique, dans les proportions suivantes :

Plasma de poule	40 %
Sérum	40 %
Extrait embryonnaire bovin	10 %
Solution saline équilibrée	10 %

(*) Nous ne parlerons pas de la méthode d'observation prolongée de Merling (109) qui ne peut entrer dans le cadre des cultures de tissus.

(**) Les auteurs utilisent de préférence le sérum fœtal en raison de sa teneur en substances activant la croissance. Ultérieurement ils lui ont substitué le sérum ultrafiltré.

Les fragments de tissus constituant le point de départ de la culture sont inclus dans ce coagulum, à raison d'une vingtaine au moins par tube. Un milieu nutritif liquide, de même composition que le substrat à l'exception du plasma, est introduit en petite quantité (10 gouttes par tube), puis les tubes sont bouchés et mis en place presque horizontalement dans un appareil rotatif. De la sorte, tubes et cultures tournent lentement sur leur axe (12 tours à l'heure), et les tissus tantôt sont baignés par le milieu liquide, tantôt au contraire restent exposés à l'air. Les repiquages sont ainsi supprimés; on se contente de prélever périodiquement la phase liquide où le virus se trouve en abondance, et de la remplacer par du liquide frais.

Une souche pure de fibroblastes humains a été cultivée ainsi pendant plus de 7 mois. Le virus provenait d'une émulsion à 20 % de cerveau de souris, inoculée préalablement avec une suspension d'un bubon inguinal prélevé chez un sujet présentant une réaction de Frei positive.

Cette technique a permis aux auteurs d'obtenir une multiplication continue du virus pendant plusieurs mois, et d'effectuer une étude très complète sur les cellules en vie, ainsi que sur des préparations colorées.

Ce remarquable travail a été suivi de nombreuses autres applications de la même méthode, parfois légèrement modifiée.

Feller, Enders et Weller (1940) (45) l'ont adaptée à la production du virus vaccinal, et à l'étude morphologique des cellules infectées en culture. Leurs travaux ont été effectués en tissus embryonnaires et plasma de poulet. Le renouvellement du milieu a lieu tous les jours, par prélèvement du liquide surnageant, qui contient le virus, puis introduction de 1,6 cm³ de liquide neuf et 20 cm³ d'air stérile.

L'agent de la grippe a été cultivé par Pearson et Enders (1941) (122) qui ont mis au point la meilleure composition du milieu nutritif et les tissus qui conviennent le mieux.

C'est une étude immunologique du virus vaccinal qu'effectuent Florman et Enders (1942) (48) en le cultivant sur leucocytes mononucléaires de lapin en plasma de poulet, leur technique s'inspirant à la fois de la technique originale des tubes roulants et de certains procédés de Carrel et Ebeling.

La psittacose est étudiée en 1946 par Morgan et Wiseman (111); ils obtiennent des quantités considérables de virus, sur tissus d'embryon et plasma de poulet, le liquide nutritif étant à base soit de sérum de lapin et d'extrait embryonnaire de poulet, soit de sérum ultrafiltré. Dans le second cas le taux de virus n'est pas supérieur au premier, mais l'avantage réside dans le fait qu'on l'obtient dans un milieu contenant un minimum de protéines et de tissus, ce dont les auteurs ont tiré parti pour préparer des vaccins.

Tous ces exemples montrent que la méthode des tubes roulants doit être considérée comme une des plus importantes, car, outre la production de virus en abondance pour une quantité de milieu restreinte, elle permet l'examen des tissus infectés à l'état vivant, ainsi que les colorations aussi souvent qu'on le désire. Les repiquages sont supprimés, le renouvellement du milieu étant réduit au remplacement quotidien de la phase liquide avec introduction d'air stérile.

Méthode de la gélose-tissu.

D'autres tentatives ont été faites pour diminuer la fréquence et la complexité des renouvellements du milieu de culture. Parmi les plus intéressantes, figure une méthode originale utilisant la gélose comme substratum, et dans laquelle la croissance du virus s'effectue dans des fragments de tissus finement découpés étalés sur celle-ci.

Un tel milieu a été créé par Zinsser et ses collaborateurs en 1937 (182), pour la culture des rickettsies. Puis Florence Fitz-Patrick l'emploie avec succès pour cultiver un virus, celui de l'encéphalomyélite des équidés (souche est) et, alors que Zia, Liu et Pang (181) l'utilisent pour cultiver *Rickettsia prowazeki*, Kurotchkin (86) a l'idée de tenter la production de virus vaccinal. Les résultats ayant été satisfaisants (16 passages), Cheever, en 1939 (33) pense à son tour que cette méthode peut convenir pour l'herpès. Il réussit en effet 11 passages en 6 semaines.

En 1940, Pang et Zia réussissent la culture du virus de l'encéphalite de Saint-Louis (40 générations en 10 mois) (118) et Tenbroek en 1941 utilise la gélose-tissu conjointement avec d'autres méthodes (Maitland; membrane chorio-allantoïque + tissu) pour la culture de la peste porcine (161).

Cette méthode s'avère la méthode de choix.

Toutes ces expériences ont été conduites en utilisant la technique de Zinsser, originale ou légèrement modifiée. Voici la description de son auteur (Zinsser et coll.) (183).

On prépare de la gélose inclinée, en mélangeant à 150 cm³ d'une solution de gélose à 4 % dans l'eau distillée, maintenue à 45°, 150 cm³ de liquide de Tyrode (solution double, mais avec seulement 1 g/litre de CO₂NaH), 150 cm³ de sérum de cheval et 8 cm³ de rouge de phénol. On répartit en tubes (8 cm³ pour un tube de 150 × 19 mm). On broie le tissu mélangé au virus (vaginale de cobaye, puis mieux embryons de souris) qu'on étale sur la gélose inclinée, et l'on bouche au caoutchouc.

Les passages sont réalisés en mélangeant le tissu ancien, prélevé par râclage de la surface de la gélose, avec du tissu frais broyé et en étalant le tout sur un tube neuf.

Cette technique assez simple a pour principal avantage l'absorption par la masse de gélose des produits de catabolisme.

Une modification d'une certaine importance a été réalisée par Yanamura et Meyer (179) qui ont remplacé le Tyrode par la solution physiologique de Simms et augmenté le taux de gélose, ce qui permettait d'avoir un milieu plus ferme et de préparation plus rapide.

Le virus de la psittacose a été cultivé parallèlement sur ce milieu et celui de Li et Rivers; la virulence des cultures s'est montrée légèrement supérieure et la production de virus pour servir d'antigène a été sensiblement plus forte avec la gélose-tissu qu'en milieu liquide.

Cette méthode est intéressante et susceptible d'emplois plus étendus.

Méthode des membranes plastiques.

L'idée de l'emploi d'un support de culture en matière plastique est venue du désir d'examen au microscope électronique des cellules et éventuellement des virus en culture. C'est ainsi qu'en 1945, Porter, Claude et Fullam (126) publient une modification de la méthode des tubes roulants.

Recouvrant des petites lames de verre de 12×22 mm d'une pellicule de matière plastique (formvar), ils les introduisent dans des flacons de culture faits spécialement pour s'adapter au support tournant de l'appareil à tubes roulants. Les lames sont collées sur une des faces du fond du flacon, les explants sont disposés sur les lames, maintenus par un petit caillot de plasma. Le lendemain, puis tous les deux jours, on introduit 1 cm^3 de solution nutritive fraîche. La culture s'étend sous le caillot et le déborde, s'étalant sur la pellicule plastique. C'est ainsi qu'après fixation on peut découper, au niveau de la zone de néo-croissance, une portion de membrane présentant des éléments intéressants et la monter sur une grille pour l'examen au microscope électronique.

S'inspirant de cette technique, J. Wirth et G. Barski, dans le service des virus de l'Institut Pasteur, ont réalisé des cultures sur membrane plastique, en milieu liquide sans plasma, de tissu épithélial embryonnaire (178). L'introduction de virus vaccinal a permis de photographier au microscope électronique des cellules rénales de lapin adulte contenant des formations semblant constituées par des inclusions spécifiques et des corpuscules élémentaires de virus (177). Ultérieurement, la même méthode a servi à la culture de divers tissus (11), qu'on a pu infecter par des virus (herpès) (13) ou dont on a pu examiner les éléments au microscope électronique (12). On peut donc dire qu'une nouvelle méthode de culture

cellulaire de virus a été créée. En voici la technique actuelle, telle qu'elle a été mise au point en 1948 par M. G. Barski.

Nous décrirons successivement :

- 1) Le matériel nécessaire;
- 2) La préparation du milieu;
- 3) La technique de mise en culture et de renouvellement du milieu, ainsi que les techniques ultérieures.

1) *Matériel.* — La culture s'effectue dans des boîtes de verre dont la base est constituée par une vitre en verre ordinaire de 12×12 cm, et le couvercle par un fond retourné ou un couvercle de boîte de Petri. Les vitres sont stérilement enduites, avec un pinceau, de 6 bandes de vaseline très chaude (de 15 mm environ de large) qui délimitent 4 fenêtres de 15×18 mm. Sur chaque fenêtre viendra s'appliquer une petite lame de verre de 20×25 mm, découpée dans une lame porte-objet et recouverte d'une membrane plastique, comme nous le verrons plus loin. Le rôle de la vaseline est multiple. Elle fixe solidement la lame à la vitre, tout en évitant la fuite du milieu liquide. En outre, elle contribue à éviter la transmission d'une infection éventuelle d'une culture aux voisines, et elle diminue la condensation à la surface de la vitre.

Des anneaux de verre sont, par ailleurs, préparés en coudant trois fois à angle droit une tige de verre de 2 mm de diamètre, de façon à obtenir un « anneau » carré, plan, de 1 cm^2 de surface intérieure. Son rôle est de maintenir par capillarité le milieu liquide nutritif.

La solution de matière plastique qui sert à préparer les membranes est une solution à 0,6 %, dans du chlorure d'éthylène, de formvar (polyvinyle de provenance américaine); elle est conservée à la glacière en tubes bouchés.

2) *Préparation du milieu de culture.* — Le milieu liquide de culture, désigné sous l'appellation de milieu WB, est préparé ainsi qu'il suit.

Du sang de poule, prélevé par ponction veineuse, est centrifugé pour le débarrasser des éléments figurés; on recueille le plasma. On prépare d'autre part de l'extrait embryonnaire, en broyant avec des billes de verre un embryon de poulet de 10 à 12 jours et en ajoutant 8 cm^3 de liquide de Tyrode; après une incubation de 15 minutes à l'étuve à 37° et une centrifugation de 15 à 20 minutes à 4.000 t/mn, on obtient un liquide opalescent qui constitue l'extrait embryonnaire.

Le liquide de Tyrode utilisé est légèrement modifié (0,30 g de PO_4NaH_2 par litre) et filtré sur Seitz après addition de rouge de phénol (0,05 g pour 100 cm^3 de solution).

A 5 cm^3 de plasma est ajoutée une quantité égale d'extrait embryonnaire, dans un tube à centrifuger garni de billes de verre. La coagulation s'effectue aussitôt, mais pour la parfaire on laisse le tube à l'étuve à 37° pendant 30 minutes. On broie ensuite le tout en agitant fortement le tube. Après centrifugation à 6.000 tours pendant 20 minutes, on recueille un liquide limpide auquel on ajoute encore 5 cm^3 d'extrait embryonnaire et 10 cm^3 de Tyrode, pour obtenir le milieu WB. Enfin ce dernier est complété par de la pénicilline (50 à 100 U/ cm^3). On peut si nécessaire conserver le milieu à la glacière pendant une semaine au moins.

3) *Mise en culture et renouvellements.* — La préparation des membranes plastiques constitue le temps préliminaire de l'opération. Une boîte de Petri est remplie de liquide de Ringer stérile et refroidi à la glacière (+ 4°). Avec une fine pipette, on laisse tomber à la surface une goutte de solution de formvar. Immédiatement cette goutte s'étale, le solvant s'évapore et il demeure une membrane extrêmement fine (1 à 5 $\text{m}\mu$) de matière plastique, dont le centre seul est visible, parce que plus épais et irrégulier. Une petite lame de verre est saisie avec une pince (du type pince à dissequer, sans griffes), introduite dans le liquide près du bord et glissée sous la membrane. On cueille celle-ci en soulevant la lame, tout en prenant soin d'éviter le centre défectueux. On égoutte rapidement, et on place la lame sur l'une des fenêtres dans la boîte de culture, la périphérie reposant sur la vaseline. L'opération est répétée pour les trois autres fenêtres, ainsi que pour toutes les autres boîtes. Après avoir bien appuyé au niveau des angles des lames pour que l'adhérence soit bonne, on dépose au centre de chacune d'elles un anneau de verre. Bien entendu, les couvercles sont remis provisoirement en place après chaque opération.

Tout étant prêt pour la mise en culture, des organes embryonnaires (cœur, poumon, cerveau) sont découpés en petits fragments de 1 à 2 mm^3 environ dans quelques gouttes de liquide de Tyrode. A l'aide d'une fine pipette, on les dispose sur la membrane plastique, à l'intérieur de l'anneau, au nombre de quatre par anneau. Puis on prélève avec la même pipette le liquide de Ringer qui demeure par capillarité entre la membrane et la lame. Pour cela, au niveau d'un angle de l'anneau, à l'extérieur de celui-ci, on appuie l'extrémité de la pipette sur la membrane qui se trouve ainsi légèrement perforée. Par cet orifice, le liquide de Ringer est facilement aspiré. De la même façon on le remplace par le milieu WB

qui pénètre sous la membrane en la faisant bomber. La quantité à introduire est de 0,2 cm³ environ. Ainsi, les fragments sont déposés à l'endroit voulu et s'y fixent toujours sans changer de place. Le milieu diffusera ensuite à travers la membrane et assurera leur nutrition. Les couvercles, remis en place, sont scellés à la paraffine et les boîtes déposées à plat dans une étuve dont la source de chaleur se trouve à la partie supérieure, de façon à éviter la condensation sur le couvercle.

Toutes les 48 heures on procède à un renouvellement du milieu. Il s'effectue très simplement, exactement comme pour la mise en culture, par prélèvement par la périphérie du liquide ancien et remplacement par du milieu neuf. Une culture accidentellement contaminée est facilement éliminée : on retire la lame correspondante.

L'examen des cultures se fait à l'état frais, en retournant la boîte avec précautions pour éviter la chute ou le glissement de l'anneau, et en la posant sur la platine du microscope dont on utilise le faible grossissement. On évalue ainsi l'état de la culture et l'importance qualitative et quantitative de la néo-croissance.

De telles cultures en milieu liquide peuvent être facilement infectées par des virus, soit au départ, en laissant incuber les explants dans une suspension virulente avant de les disposer sur les membranes, soit ultérieurement à un moment quelconque.

Fixation et coloration. — A n'importe quel stade, on peut fixer et colorer celles des cultures que l'on désire.

La fixation s'effectue en prélevant le milieu liquide pour le remplacer par le fixateur approprié. C'est le Bouin alcoolique (Bouin-Duboscq-Brazil) qui est employé de préférence. On le laisse agir pendant 2 heures puis on lave les cultures dans l'alcool à 96° pendant 2 à 24 heures.

La coloration se fait exactement comme pour des frottis ordinaires. Toutes les techniques de coloration peuvent être employées. en particulier l'hémalum-éosine et le Giemsa.

Montage au microscope électronique. — La technique de préparation d'éléments cellulaires pour leur examen au microscope électronique a été publié dans sa forme primitive (176) puis modifiée (12). Nous dirons simplement ici que dans ce cas les cultures choisies sont fixées aux vapeurs d'anhydride osmique; puis, à l'aide d'un micro-manipulateur, on dispose sur les diaphragmes porte-objet du microscope électronique les fragments de membrane plastique supportant les éléments intéressants.

Conclusion.

Cette méthode nouvelle permet d'obtenir de véritables cultures de tissus en milieu liquide. Elle réalise la dissociation de deux facteurs, milieu nutritif et support matériel, qui sont habituellement réunis dans le plasma. Ici le support est constitué par la membrane de matière plastique, le milieu étant liquide, renouvelable et modifiable à volonté. Prévue au départ pour l'étude des virus au microscope électronique, elle s'est révélée suffisamment générale pour pouvoir être employée comme méthode courante de culture des virus en divers tissus.

CONCLUSION GENERALE DU CHAPITRE

Tels sont les principales méthodes, classiques et modernes, qui permettent de cultiver les virus en culture de tissus. Créées généralement pour un but déterminé, elles ont pu être étendues à bien d'autres emplois. Nous verrons dans les chapitres suivants, à propos de chaque application pratique, comment les auteurs en ont tiré parti.

CHAPITRE II

Comportement des virus en culture de tissus et lésions histologiques qu'ils provoquent

DONNEES GENERALES D'ETUDE

Une des principales applications de la culture de virus en présence de cellules proliférantes cultivées *in vitro* est l'étude des altérations cellulaires qu'ils provoquent. En effet, au cours de la culture de tissus, la présence du virus et son développement modifient souvent l'aspect habituel des cellules et leurs rapports respectifs. Ces modifications peuvent consister soit en métamorphoses soit en lésions histologiques plus fines, intéressant le noyau ou le cytoplasme. De telles modifications correspondent le plus souvent à celles qu'on rencontre dans les organismes infectés par ces virus. Pourquoi doit-on faire appel aux procédés de culture *in vitro* pour étudier ces altérations pathologiques? C'est qu'ils présentent un certain nombre d'avantages.

Beaucoup de tissus sont sensibles *in vitro*, même lorsqu'ils proviennent d'organes réfractaires ou d'animaux d'une espèce non réceptive au virus. On a donc un grand choix de tissus à sa disposition.

Le tissu explanté est à l'abri des facteurs nerveux, humoraux, de l'interaction des autres tissus auxquels il est soumis dans l'organisme. L'action de l'agent pathogène sur la croissance peut y être étudiée. On peut conserver les tissus en culture aussi longtemps qu'on le désire et y suivre l'évolution du virus, sans qu'elle soit interrompue par la mort de l'animal ou tout autre phénomène arrêtant l'infection.

L'étude *in vitro* est, si la technique est suivie de façon rigoureuse, à l'abri des contaminations secondaires, germe de sortie, infections cutanées, etc. qui peuvent altérer la réponse de l'organisme à l'infection par le virus.

Pour toutes ces raisons l'étude en culture de tissus est le complément nécessaire de l'étude histologique directe des organes des animaux infectés. Elle permet, en particulier, d'éclairer le processus de formation des lésions spécifiques (inclusions) qu'on rencontre fréquemment dans les maladies à virus.

Par opposition, les différentes techniques de culture des virus *in ovo* se prêtent mal à l'étude histologique. Certains virus tuent rapidement l'embryon sans donner de lésions caractéristiques (peste aviaire, stomatite vésiculeuse, encéphalomyélite équine, etc.). D'autres provoquent des lésions de l'embryon ou de la membrane chorio-antoïque, mais il est souvent difficile de déterminer la part exacte du virus dans les altérations apparues après son inoculation.

Récemment, un nouvel élément a renforcé considérablement l'intérêt des cultures cellulaires pour l'étude des modifications histopathologiques provoquées par les virus : l'utilisation de la microscopie électronique. Celle-ci nécessite des objets très minces (5 à 500 m μ), difficiles à réaliser par les techniques classiques de préparation des coupes histologiques. Sans exclure les examens pratiqués sur des cellules prélevées directement *in vivo*, au niveau même des lésions ou dans les excréta, on conçoit l'utilité de la culture *in vitro* pour obtenir des images du virus à l'intérieur des cellules.

L'étude des lésions histologiques et du comportement du virus en culture nécessite, pour avoir toute sa valeur, des examens répétés s'étendant sur une durée suffisante pour permettre, par exemple, de mettre en évidence un cycle vital (comme nous le verrons plus loin). On peut :

soit explanter un fragment d'organe infecté, c'est-à-dire dont les cellules contiennent déjà le virus,

soit introduire le virus dans la culture au départ ou à un stade ultérieur quelconque, une culture pouvant ne pas être également réceptive à tous les âges.

L'étude s'effectue par un ou plusieurs des procédés ci-dessous :

= Examen de la culture à l'état vivant, avec ou sans coloration vitale,

— par lumière directe,

— au fond noir,

— ou même en contraste de phases.

= Fixation par les procédés habituels (Bouin, Zenker-formol, etc.) suivie de coloration des cultures, soit en masse (cultures fines) soit après coupes (cultures dans un caillot plasmétique épais). Principales colorations employées : Giemsa, Mann, Hémalum-éosine, Macchiavello, Castañeda, etc.

= Fixation spéciale et montage au microscope électronique.

L'étude s'effectue à divers stades. L'examen à l'état frais, direct ou au fond noir, peut se faire à tout moment et se renouvele aussi souvent qu'on le désire, plusieurs fois par jour si nécessaire. On a même utilisé des dispositifs permettant aux cultures d'être examinées en permanence au microscope, tout en restant à la température de culture (généralement 37°). Une même culture peut ainsi être suivie en permanence pendant un certain nombre d'heures ou de jours.

Des cultures parallèles peuvent être fixées et colorées à intervalles réguliers ou bien chaque fois qu'on désire garder un témoin durable d'un stade intéressant ou caractéristique.

C'est ainsi qu'on a pu mener à bien l'étude complète du comportement d'un certain nombre de virus grâce à la culture de tissus, associée ou non à l'étude *in vitro* et parfois *in ovo*. Nous allons en donner quelques exemples, qui permettront d'avoir une idée des différentes techniques pratiques et des résultats qui ont été obtenus.

1° VIRUS PRODUISANT DES INCLUSIONS INTRA-CYTOPLASMIQUES

VIRUS VACCINAL

Les études histo-pathologiques concernant ce virus ont été effectuées en utilisant la méthode en plasma, puis celle des Tubes roulants, et celle des Membranes plastiques.

Cultures en plasma.

Elles ont permis d'établir la possibilité de formation des corps de Guarnieri dans des cellules épithéliales *in vitro*, et contribué à éclairer leur mécanisme d'évolution.

Rivers, Haagen et Muckenfuss, en 1929 (129), scarifiant préalablement la cornée d'un lapin avec du virus vaccinal, en cultivent des fragments en caillot plasmatique dans un tube à essais. Après 24 à 48 heures, les coupes des cultures, colorées, montraient une croissance de cellules épithéliales contenant des corps de Guarnieri typiques, ces formations étant absentes des cultures-témoins non infectées.

Nauck et Robinow (1935) (114) cultivent sur lames de mica des cellules épithéliales provenant de cornée ainsi que de rein de lapin adulte. Un certain nombre de cultures sont infectées secondairement et l'ablation de l'explant permet une étude suivie à l'état frais, des colorations étant également faites à tous les stades sur la lame même. Il est intéressant de noter que les auteurs ont obtenu la formation de corps de Guarnieri dans du tissu rénal, bien qu'ils n'aient pu élucider le mécanisme de cette formation.

En 1937, Haagen et Kodama (67) essaient d'établir une relation entre l'apparition des corpuscules de Paschen et celles des corps de Guarnieri, et constatent que ces derniers apparaissent plus rapidement dans les épithéliums cornéens et cutanés que dans ceux des autres organes des embryons de lapin et de poulet.

L'étude exécutée en 1938 par Bland et Robinow (18) (19) est très détaillée et abondamment illustrée de microphotographies. Cultivant en goutte pendant la cornée de lapin en plasma homologue, ces auteurs introduisent le virus au moment où se forme dans la partie liquéfiée du plasma une mince couche de cellules

néo-formées. Dans les 24 heures qui suivent, les cultures sont, à diverses reprises, fixées aux vapeurs d'anhydride osmique et colorées au Giemsa.

Les auteurs décrivent ainsi cinq types de formations qui se succèdent, avec tous les stades intermédiaires. Ce sont :

les petits corps homogènes, compacts, à contours nets, allant de la taille d'un corps élémentaire à celle d'un staphylocoque;

les grands corps homogènes, plus volumineux;

les petits, moyens et grands réseaux, formations plus diffuses, à contours irréguliers, formés d'une masse fondamentale rose, légèrement granuleuse et réticulaire, contenant de petits éléments bleu-violet, parfois divisés au stade ultime en un grand nombre de petites granulations, de la taille des corpuscules élémentaires.

En outre, les corps élémentaires eux-mêmes sont visibles dans les cellules au stade de début, puis disparaissent pour reparaitre en nombre au stade terminal.

Nous voyons donc qu'il s'agit de la description d'un véritable cycle du virus, dont les corps élémentaires, pénétrant dans la cellule, s'y multiplient en constituant des inclusions. Celles-ci grandissent et finissent par éclater en libérant de nouveaux corps élémentaires dans le cytoplasme, où ils peuvent ou non se multiplier. En conséquence, dans l'infection de l'épithélium cornéen, l'inclusion est un stade obligatoire et représente, au moins en partie, une colonie de virus.

Cultures en tubes roulants.

Cette méthode a servi à l'étude que Feller, Enders et Weller (45) ont effectuée en 1940 sur la culture du virus vaccinal. Ce n'est plus ici seulement le tissu épithélial qui permet la prolifération du virus avec formation d'inclusions, mais un mélange de tissus ou des fragments de cœur d'embryon de poulet, l'un et l'autre procédé donnant lieu à une croissance surtout fibroblastique.

L'étude morphologique est possible aussi bien à l'état frais que sur des préparations colorées. En effet, la minceur de la couche de plasma, compensée par la présence de milieu liquide, facilite l'examen, malgré la courbure du champ due au principe même de la culture (tubes rotatifs). Dans ces conditions, les résultats suivants ont été acquis.

Dans les cultures examinées à l'état vivant, on peut se rendre compte que dans l'ensemble, la présence du virus n'agit pas sur la croissance, excepté à un taux très élevé. En particulier, il n'existe pas de relation entre la présence du virus et l'apparition des gra-

nulations et vacuoles grasses qui caractérisent la culture âgée de quelques jours.

Sur les préparations colorées, il est possible de constater que même dans les cultures infectées, il se trouve encore des cellules proliférantes au 59^e jour, mais les mitoses sont plus abondantes dans les cultures jeunes de 5 à 10 jours.

Les cultures infectées, à l'exclusion des autres, montrent des inclusions cytoplasmiques dès le 2^e jour après l'inoculation. Ces formations, très nombreuses du 5^e au 10^e jour, persistent encore au 59^e jour. Elles sont fréquemment en position para-nucléaire. Leur aspect varie entre deux types extrêmes avec tous les intermédiaires :

1) Agglomérats de granulations acidophiles minuscules, de forme et de dimensions irrégulières, pouvant occuper presque tout le cytoplasme;

2) Formations irrégulièrement ovalaires, denses, semi-homogènes, moins acidophiles et de dimensions moins irrégulières que les précédentes, présentes au nombre de une, deux, dans le cytoplasme cellulaire.

On ne trouve jamais d'inclusion dans les cellules présentant des figures de mitoses.

Ces inclusions sont situées de préférence dans les cellules d'aspect fibroblastique, et quelquefois dans les cellules rondes à l'aspect monocytaire (il est d'ailleurs impossible d'établir que ce soit deux types de cellules d'origine distincte). La distribution des inclusions est très irrégulière, certaines zones en étant remplies, d'autres complètement dépourvues, bien que situées à peu de distance des précédentes. C'est en général dans les zones de fibroblastes en croissance active qu'on trouve le plus d'inclusions.

Tels sont les résultats de la culture du virus vaccinal en tubes roulants.

Cette méthode qui rend possible une culture prolongée, a donc permis d'établir :

1) Que non seulement l'épithélium, mais les fibroblastes et même les macrophages peuvent permettre la croissance du virus vaccinal, avec formation d'inclusions;

2) Que ces cellules, bien qu'exposées constamment au virus, restent viables pendant un temps prolongé (59 jours au moins).

Culture sur membranes plastiques.

On a vu que le virus vaccinal pouvait se développer dans des cellules rénales en y donnant des inclusions. Dans le Service des Virus de l'Institut Pasteur, on a utilisé la méthode des membranes plastiques pour pouvoir soumettre de telles cellules à l'examen au microscope électronique (177). Des cultures pures de cellules

rénales de lapin adulte ont été obtenues ainsi et infectées secondairement avec une suspension de corpuscules élémentaires de dermo-vaccine. Une partie de ces cultures a été colorée au Mann, ce qui a révélé la présence de corps de Guarnieri typiques. D'autres cultures, fixées aux vapeurs d'anhydride osmique, ont été examinées au microscope électronique. Dans certaines zones relativement épaisses, on a pu observer des inclusions arrondies ou ovalaires allant de la taille d'un corpuscule élémentaire à celle d'une vingtaine de ces corpuscules. Ailleurs, dans des zones plus minces, apparaissent des formations composites semblant constituées par des corpuscules élémentaires distincts les uns des autres. Dans leur voisinage immédiat se trouvent de petites inclusions isolées présentant la taille et la configuration de corps élémentaires.

Conclusions.

Le développement du virus vaccinal en culture de tissus, quelle que soit la technique utilisée, s'accompagne d'une multiplication des corps élémentaires et de formations acidophiles, présentant les caractères de spécificité des corps de Guarnieri.

En outre, des cellules en culture, provenant du rein ou d'autres organes dans lesquels on ne constate jamais, *in vivo*, de corps de Guarnieri, permettent d'obtenir des corps de Guarnieri typiques.

Il ne nous est pas possible actuellement de préciser le mécanisme exact de cette différence de comportement.

Il semble bien que le virus vaccinal, à l'intérieur des cellules, passe par une sorte de cycle partant du corps élémentaire pour y aboutir de nouveau, après multiplication à l'intérieur des inclusions. L'examen au microscope électronique des cellules infectées n'a pas démenti cette hypothèse établie sur l'observation des préparations colorées par la technique habituelle.

VIRUS DE LA PSITTACOSE

Les méthodes qui ont été employées pour l'étude des lésions histologiques dues au virus psittacosique sont diverses. Cultures sur verre, en milieu liquide, méthode de Li-Rivers, gélose-tissu. Ce virus, de grande taille (250 à 500 $m\mu$) détermine la formation d'inclusions cytoplasmiques, bien visibles avec et sans colorations, que les auteurs tendent à considérer comme de véritables « colonies de virus ».

Nous allons voir que malgré la diversité des techniques, les

résultats des auteurs, loin de s'opposer, se complètent et permettent d'aboutir à une conclusion logique.

Cultures en milieu liquide sur verre.

Bédson et Bland ont publié en 1932 (15) puis en 1934 (16) les résultats d'une série d'études du virus de la psittacose. L'examen histologique des coupes d'organes prélevés *in vivo*, a été complété par la culture de tissus sensibles au virus.

Cette dernière méthode a confirmé les données obtenues par l'étude directe des organes.

Puis en 1935 Bland et Canti (17) publient les résultats de nouveaux travaux, résumant et complétant les précédents. L'étude de la croissance et du développement du virus psittacosique en culture de tissus a permis d'aboutir à des notions intéressantes, en particulier sur l'existence d'un cycle vital de l'agent pathogène.

Le matériel employé dans ces dernières expériences consiste dans la rate de souris adulte et divers tissus d'embryon de poulet, en particulier le muscle de la cuisse, donnant une croissance fibroblastique, et l'épithélium pulmonaire. Ce dernier est cultivé en milieu liquide sur verre (technique de Maximow avec double lamelle) alors que les fibroblastes sont d'abord cultivés en plasma, puis repiqués en milieu liquide, pour avoir des éléments isolés.

L'infection est réalisée soit au moment de la mise en culture soit après une certaine croissance cellulaire, ce qui a donné de meilleurs résultats. L'incubation a eu lieu d'abord à 32°, puis à 37°, quand il a été reconnu que la première température n'offrait pas d'avantages.

La coloration employée est le Giemsa.

Ainsi les auteurs ont pu décrire une série de phases successives.

1) Phase non identifiable (jusqu'à 8 heures après l'infection). Les cellules sont normales; mais on rencontre un grand nombre de corps élémentaires extra-cellulaires.

2) Phase des plaques apparemment homogènes (entre 8 et 24 heures environ). Les corps élémentaires extra-cellulaires s'altèrent et ont disparu à la 18^e heure. Les plaques apparemment homogènes se révèlent, après différenciation par l'acétone, constituées d'une substance fondamentale rose (gangue) avec des éléments plus foncés. Les plaques sont en fait des colonies des grandes formes du virus.

3) Phase des grandes formations (18 à 24 heures après l'infection). Les mêmes formations sont visibles maintenant sans différenciation. En réalité, à ce stade, on trouve tous les types de colo-

CELLULES NERVEUSES EN CULTURE
SUR MEMBRANES PLASTIQUES

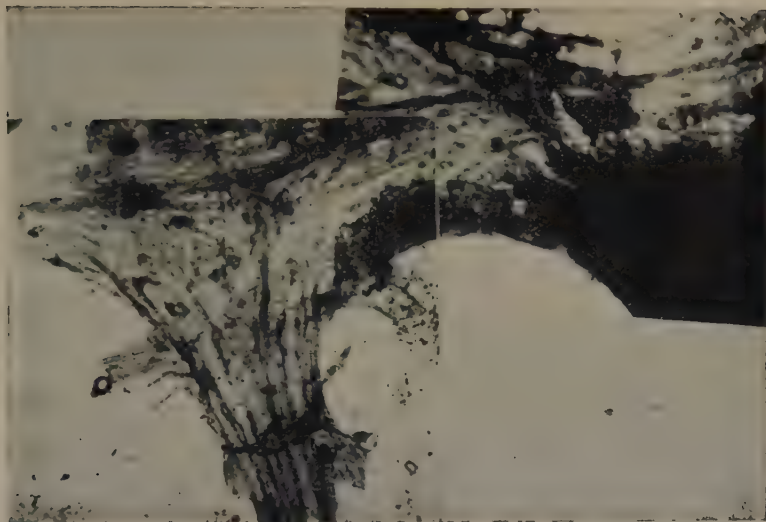
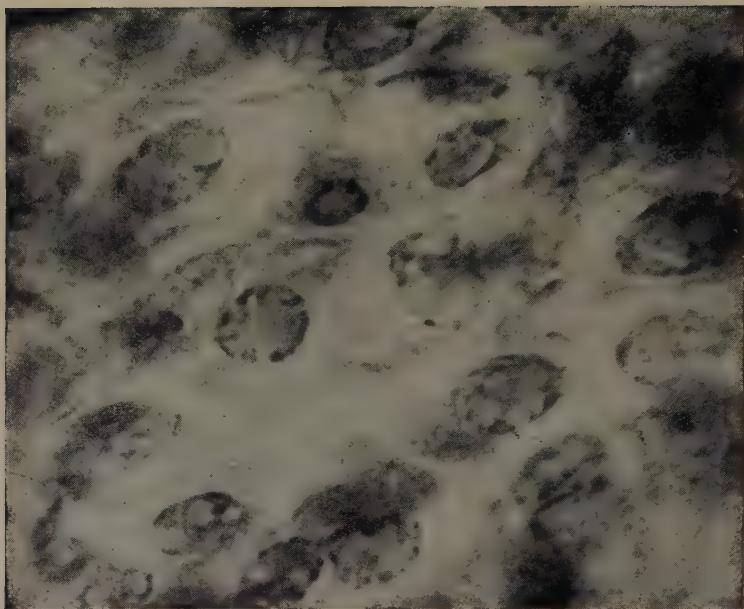


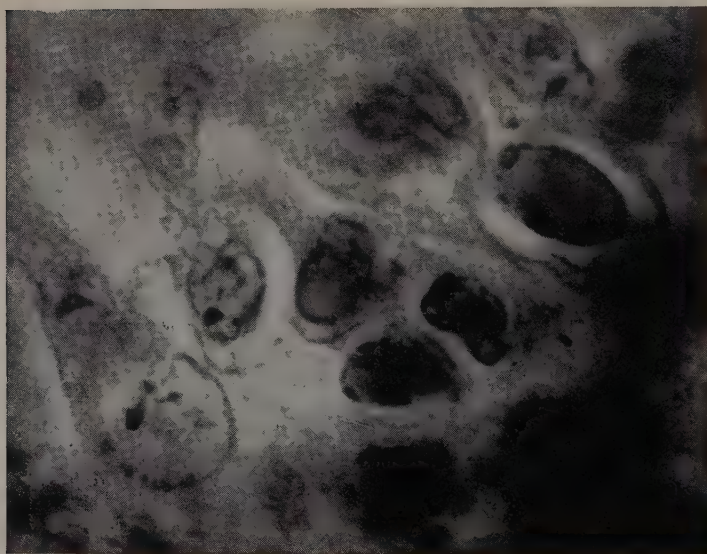
Figure 1. — Fragment de neuroblaste de mésencéphale d'embryon de poulet après 48 heures de culture, photographié au microscope électronique (grossissement 8.000).



Figure 2. — Culture de 18 jours de mésencéphale d'embryon de poulet, infectée avec le virus herpétique. Zone non atteinte (comparer avec les figures 3 et 4.) Microscope optique (grossissement 1.800).



Figures 3 et 4. — Culture de 18 jours de mésencéphale d'embryon de poulet, infectée avec le virus herpétique. Zones atteintes par la dégénérescence nucléaire spécifique. Microscope optique (grossissement 1.800).



nies depuis les plaques homogènes jusqu'à celles où la gangue est presque invisible.

4) Phase des formations intermédiaires (24 à 48 heures après infection). Le tableau est plus varié. On trouve des colonies composées de particules intermédiaires en forme et couleur entre les grandes formations et les corps élémentaires. Beaucoup de colonies contiennent un mélange de particules de formes différentes. Vers la fin de cette période les corps élémentaires commencent à apparaître sous la forme de petits points violet foncé.

5) Phase des corps élémentaires (48 à 72 heures). Même à ce stade on peut encore voir des traces de substance fondamentale homogène, rose. Dans les cultures âgées, les colonies de corps élémentaires peuvent être énormes : elles finissent par remplir tout le cytoplasme et quelquefois font éclater la cellule.

Parfois on peut voir 2 ou 3 colonies de corps élémentaires dans une même cellule.

A tous les stades, les colonies sont bien séparées du cytoplasme, avec souvent l'aspect d'une capsule.

A côté de ces résultats obtenus sur préparations colorées, les auteurs décrivent en détail l'aspect des cultures vivantes examinées au fond noir, à la lumière transmise et sur un film cinématographique accéléré. Ceci permet de voir en particulier que les plaques du début du cycle sont immobiles. Peu à peu les éléments qui les constituent se mobilisent, au point que dans les colonies de corps élémentaires les particules présentent un mouvement brownien parfaitement net.

Ces aspects des cellules en vie sont tout à fait en accord avec ceux trouvés dans les préparations colorées.

On peut conclure que la technique de culture de tissus a permis aux auteurs d'observer les cellules atteintes en vie et de confirmer pleinement les aspects vus chez l'animal, en particulier l'existence d'un cycle intra-cellulaire (et jamais de développement extra-cellulaire). Il est à noter qu'après une semaine d'infection en culture de tissus, on ne constate pas de répétition du cycle, comme c'est le cas chez l'animal lorsqu'il n'a pas succombé après 48 heures.

Culture en milieu de Li et Rivers.

La même année 1935, Levinthal (93) publie les résultats de travaux de 1934. L'auteur utilise le milieu de Li et Rivers, constitué seulement, rappelons-le, par du tissu d'embryon de poulet finement découpé, en suspension dans du Tyrode.

Ce milieu fournit une abondante croissance du virus et des passages sont effectués sans diminution de virulence (jusqu'à 10^8). Ces cultures réalisent, d'après l'auteur, un excellent matériel pour observer le développement du germe aux différents stades de culture; elles mettent en évidence le pléomorphisme du germe.

La multiplication du virus se produit exclusivement en tissu survivant, de préférence dans les éléments épithéliaux ou endothéliaux. Deux aspects principaux sont définis :

1) Dans un milieu fraîchement préparé, le virus est retrouvé principalement sous la forme d'inclusions cellulaires fortement colorées de taille et de forme très variables. Ces inclusions sont semblables à celles d'autres maladies à virus, avec cette différence que la substance fondamentale est basophile;

2) A un stade plus avancé, ces corpuscules sont remplacés de plus en plus par des colonies intra-cellulaires de formes diverses, composées de corps élémentaires de virus.

On peut d'ailleurs voir en même temps ces formes extrêmes et toutes les formes intermédiaires.

Les inclusions, qui correspondent aux grandes plaques de Bland et Canti, ne sont pas pour l'auteur un stade essentiel de la croissance du virus. Elles ne se développent que lorsque le virus rencontre une forte résistance chez la cellule-hôte. Seules des cellules en bonne santé peuvent offrir cette résistance qui se manifeste par la formation de la gangue autour des particules de virus envahissantes. Dans ces conditions, le virus est incapable de se multiplier mais augmente de volume jusqu'à former une masse où les détails sont masqués par une gangue épaisse. Cette masse constitue l'inclusion. Ulérieurement, quand la cellule est affaiblie, le virus se multiplie par division et on voit apparaître des corps élémentaires typiques en grand nombre. Mais dans le cas où le virus rencontre une cellule déjà lésée, en état de moindre résistance, il se multiplie d'emblée sans qu'il y ait formation d'une gangue autour de lui.

Cultures sur gélose-tissu et autres milieux.

Ces études ont été reprises en 1941 par Yanamura et Meyer (179). Le virus de la psittacose est cultivé parallèlement en milieu de Li et Rivers, sur gélose-tissu et dans le sac vitellin de l'œuf de poule en incubation.

La difficulté de pratiquer des examens histologiques sur des cultures en milieu liquide tel que celui de Li et Rivers a été surmontée par l'artifice suivant. Les cultures entières étant transfé-

rées dans des tubes à essais, on laisse déposer au fond les fragments de tissus d'embryon de poulet. Puis le liquide surnageant est prélevé à la pipette, et l'on ajoute une goutte de plasma de canard et une goutte d'extrait embryonnaire de poulet. Les fragments sont ainsi inclus dans un coagulum. L'ensemble est fixé au Zenker-formol (liquide de Helly), puis inclus en paraffine et débité en coupes minces.

L'affinité du virus pour certains tissus a été étudiée en réalisant des suspensions dans le Tyrode de fragments d'organes isolés au lieu d'embryons entiers. De cette manière, les auteurs infirment les résultats de Bland et Canti sur la croissance en épithélium pulmonaire, et ceux de Levinthal et de Haagen et Crodel (66) sur la préférence du virus pour le tissu épithélial ou endothélial. Les éléments mésenchymateux et les fibroblastes sont en effet plus aptes à la multiplication du virus, bien que celui-ci puisse se développer pratiquement dans tous les tissus de l'embryon de poulet.

Mais la partie de l'étude qui nous intéresse le plus ici est la description des aspects visibles sur les frottis et les coupes colorées des fragments de tissus infectés. Les auteurs signalent d'abord que les particules de virus observées dans les frottis de cultures préparés au cours des différents stades de l'incubation et colorés au Macchiavello ont généralement l'aspect décrit par Bland et Canti. Cependant, les grandes formations se rencontrent encore après 72 heures d'incubation, dans les cultures infectées par une forte dose de virus.

Dans les coupes, les aspects observés correspondent bien aux descriptions de Bland et Canti, Levinthal, et Burnett et Rountree (23) (ces derniers auteurs ayant réalisé des cultures du virus de la psittacose sur membrane chorio-allantoïque d'œuf de poule). Yanamura et Meyer en déduisent l'interprétation suivante du cycle de développement du virus.

Un ou plusieurs corps élémentaires de virus envahissent une cellule et déterminent, si la cellule est en bonne santé, la formation d'une gangue ordinaire (quelquefois plusieurs, si le virus pénètre simultanément en des points éloignés d'une même cellule). À l'intérieur de la gangue, les corps élémentaires augmentent de volume et se multiplient par division. On a alors l'aspect décrit par Bland et Canti sous le nom de plaque et par Levinthal sous le nom d'inclusion. Quoique Levinthal n'ait pas pu voir les particules de virus dans son inclusion à cause de l'extrême densité de la gangue, Bland et Canti ont surmonté la difficulté par la décoloration poussée à l'aide d'acétone. Ici, les particules de virus peuvent facilement être retrouvées dès les stades les plus précoces car elles sont colorées en rouge, la gangue étant bleue. Les auteurs penchent plutôt pour l'interprétation de Bland et Canti relativement à un accroissement

du nombre des particules de virus, en même temps que de leur taille, dès cette période du cycle, contrairement à l'opinion de Levinthal.

Par la suite, les particules se multiplient de façon plus importante tout en diminuant de taille, en sorte qu'elles aboutissent à des corps élémentaires typiques. En même temps la gangue devient moins dense et se liquéfie, comme Bland et Canti l'ont vu dans les préparations examinées à l'état vivant. Finalement il s'est formé une colonie de virus à maturité. La cellule hôte finit par mourir et s'autolyse, libérant ainsi un grand nombre d'éléments particuliers capables d'envahir de nouvelles cellules; ainsi se renouvelle le cycle. On trouve en effet des formes précoces même dans une culture qui a atteint son maximum d'infectiosité.

Enfin, les auteurs confirment l'observation de Levinthal, que dans des cellules déjà lésées le virus se multiplie sans qu'il y ait formation de gangue.

En conclusion, le cycle morphologique du virus psittacosique dans les cellules est pleinement établi. On considère que les inclusions cytoplasmiques sont de véritables colonies de virus. Quant à la gangue, elle serait une production du cytoplasme.

Conclusion.

Tels sont les résultats obtenus par les différents auteurs qui ont étudié le comportement du virus de la psittacose en culture de tissus.

Les descriptions que nous avons reproduites montrent clairement quel rôle de premier plan la culture cellulaire a joué dans la résolution du problème. Seule l'observation des cellules en vie a permis d'établir sûrement ce que l'examen des organes fixés et colorés avait déjà suggéré. Nulle méthode autre que la culture de tissus ne permet plus facilement cette observation qui peut être prolongée aussi longtemps qu'on le juge nécessaire. Grâce à elle nous pouvons donc admettre que le virus psittacosique réalise, à l'intérieur des cellules vivantes, un cycle vital qui part des corps élémentaires pour y revenir, après avoir revêtu un certain nombre d'aspects bien décrits. Cependant quelques différences subsistent entre le comportement du virus dans l'organisme et en culture. Le fait qu'on ne puisse, à l'heure actuelle, pas encore les expliquer ne diminue en rien la valeur de la méthode de culture de tissus en tant que moyen d'étude du virus à l'intérieur des cellules.

VIRUS DE LA LYMPHOGRANULOMATOSE INGUINALE

(*Maladie de Nicolas et Favre*)

Ce virus, comme le précédent, avec lequel il offre d'ailleurs un certain nombre d'analogies, est de grande taille (160 à 500 $m\mu$). Pour l'étude histo-pathologique on a employé la méthode classique en plasma, puis la méthode des tubes roulants. Les résultats sont du même ordre que ceux obtenus pour le virus de la psittacose.

Cultures en plasma.

La première étude importante a été réalisée par Miyagawa et ses collaborateurs (110), ceux-là même qui ont reconnu et décrit les granulo-corpuscules, agents pathogènes de cette maladie.

C'est la méthode de la goutte pendante qui a été utilisée par ces auteurs, ainsi que ceux qui les ont suivis dans cette voie.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en cultivant côte à côte, dans un même caillot plasmatique, un fragment de cerveau de souris malade inoculée au préalable avec une émulsion virulente et un fragment d'organe sain (testicule ou rate de souris, membrane chorio-allantoïque d'embryon de poulet). Dans ces conditions, au bout de 3 à 9 jours on retrouve les granulo-corpuscules spécifiques dans les cellules du tissu primitivement sain, ainsi que dans le liquide de culture.

La culture de tissus n'a pas donné lieu ici à une étude histo-pathologique à proprement parler, mais lui a ouvert la voie en démontrant la possibilité d'obtenir *in vitro*, dans les cellules elles-mêmes, les éléments responsables de la maladie.

A la suite des travaux de Nauck (113) sur les méthodes de colorations applicables à ce type de germes, son collaborateur Malamos (104) (105) publie les résultats de ses recherches, effectuées dans l'intention de confirmer les données acquises sur la morphologie et le comportement de l'agent pathogène par l'étude histologique des organes d'animaux inoculés et le développement du virus sur membrane chorio-allantoïque. La culture en goutte pendante, par la méthode de Nauck et Paschen, de cornée de lapin infectée par le virus, fixée au sublimé après 8 à 48 heures d'étuve et colorée au Giemsa, a permis d'observer une évolution intéressante. Au début, dans quelques cellules apparaît une inclusion para-nucléaire colorée en bleu vif. Puis on distingue au fort grossissement, dans cette inclusion, des corpuscules rouge violacé tout à fait comparables à ceux qu'on observe dans les frottis de lymphogranulome

inguinal. L'inclusion augmente de volume, les corpuscules se multipliant à son intérieur; tout autour le cytoplasme se vacuolise. Puis la substance fondamentale se désintègre en éléments filiformes et granuleux, libérant fréquemment les corps élémentaires, et finalement on ne retrouve dans les vacuoles que des débris de la substance bleue.

Les cellules atteintes ne sont pas envahies dans leur ensemble, l'évolution restant limitée à l'intérieur des vacuoles. Il est rare que le noyau soit altéré.

Outre l'aspect morphologique, identique à celui retrouvé dans les ganglions humains et les cerveaux de singe et de souris, l'inoculation des cultures aux animaux, en reproduisant la maladie typique, permet de conclure qu'il s'agit bien là de l'agent responsable de l'affection.

Quelques temps après, Manabé (1939) (106) obtient de nouveau la culture du virus lymphogranulomateux dans différents tissus en goutte pendante, et étudie le développement des granulo-corpuscules pendant 4 ou 5 jours. Il complète son étude par l'examen au fond noir du virus en culture. Les corpuscules apparaissent animés d'un vif mouvement, se multiplient à l'intérieur de la cellule qu'ils abandonnent au bout d'un certain temps pour envahir les cellules voisines. Ces formations sont souvent groupées en amas, parfois par deux.

Cultures en tubes roulants.

Nous avons vu (p. 16) que c'est pour l'étude de l'agent de la maladie de Nicolas et Favre que la méthode des tubes à rotation axiale a été appliquée pour la première fois par Gey et Bang (61) à la culture des virus. Ces auteurs ont ainsi précisé le mécanisme de l'évolution intra-cytoplasmique de l'élément pathogène et les divers aspects qu'il peut réaliser. Ces travaux constituent d'ailleurs la première étude cytopathologique sur des cellules infectées en vie.

L'observation quotidienne des cultures à l'état vivant à travers les tubes, ainsi que l'explantation en goutte pendante de certains éléments de culture suivie de l'observation directe ou après coloration des colonies à divers stades, ont permis là encore d'établir une description du cycle évolutif du virus en culture. On a pu voir ainsi l'agent pathogène pénétrer dans les cellules et s'y développer jusqu'à réaliser la mort et la destruction de celles-ci.

C'est 12 jours après l'introduction du virus dans les cultures que sont apparues les premières modifications : l'apparition dans le cytoplasme de petites vacuoles transparentes. D'abord sem-

blables aux vacuoles qu'on observe habituellement dans les cellules en culture, elles augmentent rapidement de volume et l'on voit apparaître en elles de petites granulations. Ces éléments spécifiques sont les granulo-copuscules déjà décrits par les auteurs précédents. Peu nombreux au début, de forme irrégulière, de dimensions inférieures à $1\ \mu$, on les observe principalement contre la paroi de la vacuole que les auteurs désignent sous le nom de vésicule. Cette disposition visible à l'état frais, se retrouve dans les éléments colorés au Giemsa.

Les vésicules, en grandissant, finissent par occuper une grande partie du cytoplasme, repoussant le noyau à la périphérie. Elles sont remplies de granulations uniformes de $0,3\ \mu$ de diamètre environ, et qui examinées à l'état vivant, apparaissent animées de mouvement brownien. Ces granulations se présentent souvent sous forme diploïde.

A ce stade on a remarqué que certaines cellules émettaient de longs prolongements. Quelques-unes vont même jusqu'à émigrer à distance en emmenant leur contenu. Différentes formes aberrantes ont été signalées : présence dans la même cellule de deux vésicules, comprimant le noyau entre elles; vésicules à contours irréguliers et encochés. Les cellules parasitées ne semblent pas se diviser.

Le cycle se termine par la rupture des vésicules qui laisse en place le contenu granuleux. Il est très vraisemblable que les éléments ainsi libérés vont pouvoir pénétrer de nouvelles cellules, début d'un nouveau cycle.

Pour provoquer dans une culture vierge l'apparition des vésicules et le déclenchement du processus décrit, il suffit d'y ajouter quelques gouttes du liquide surnageant d'une culture infectée. Plusieurs passages ont ainsi été réalisés par les auteurs, les modifications cyto-pathologiques ayant ainsi pu être observées pendant plus de 7 mois.

Conclusion.

L'analogie du comportement intra-cellulaire du virus lymphogranulomateux avec celui de la psittacose est bien mise en évidence par les différents travaux que nous venons de résumer. Le virus envahit les cellules, s'y multiplie en donnant des inclusions cytoplasmiques qui, parvenues à maturité, éclatent en libérant des corps élémentaires identiques à ceux du début. Ici encore, c'est la culture de tissus qui a permis l'observation des cellules en vie, meilleur moyen d'étude du comportement intracellulaire du virus.

VIRUS DE L'ECTROMÉLIE INFECTIEUSE

Ce virus d'une maladie de la souris est encore un de ceux qui donnent de belles images d'inclusions. Bien que les résultats soient moins importants que ceux des virus précédents, d'intéressantes études histo-pathologiques ont été effectuées en culture de tissus.

Successivement la méthode de Maitland et la méthode en plasma ont été ainsi employées.

Cultures en milieu liquide.

C'est Downie et McGaughey, en 1935 (39), qui, malgré les difficultés rencontrées du fait du principe même de la méthode, ont effectué des études histologiques sur des fragments d'organes cultivés en milieu de Maitland ou même de Rivers : peau ou embryon entier de souris d'abord, puis reins et foie de souris adultes, et embryon de poulet, ces tissus finement découpés étant en suspension dans du sérum dilué de souris ou de poule.

Après incubation, les fragments sont prélevés, lavés dans une solution de Tyrode, fixés au sublimé et inclus en paraffine. Les coupes qui en sont faites sont colorées soit au Mann, soit par la fuchsine acide et le vert de méthyle.

Dans d'autres cas, ce sont les fines membranes de cellules de néo-croissance apparues dans le fond du flacon qui ont été prélevées, étalées sur lames, fixées et colorées.

Ces diverses techniques ont permis d'obtenir les résultats suivants :

1. — *Dans les tissus de souris.* — a) Tissus embryonnaires. — Après 2 à 4 jours d'incubation apparaissent des inclusions, petites granulations acidophiles situées dans le cytoplasme. Elles sont encore en petit nombre, bien que le titrage de la culture montre un taux de virus souvent très élevé. Puis les inclusions grandissent et augmentent de nombre. Au bout de 7 ou 8 jours, les formations sont toujours retrouvées s'il y a eu croissance du virus. C'est jusqu'au 12^e jour qu'on peut les mettre en évidence, bien qu'alors les tissus soient en pleine dégénérescence (celle-ci est d'ailleurs plus rapide que dans les cultures non infectées servant de témoin).

Le développement des inclusions est plus précoce lors des passages que durant la première culture.

Quels sont les tissus atteints de préférence? L'épithélium cutané d'abord, où l'aspect est semblable à celui de la peau d'une souris ayant subi une injection intradermique. Les cellules d'origine méso-

blastique sont également réceptives, spécialement les cellules d'aspect fibroblastique qui voisinent avec le cartilage.

Comme dans l'infection expérimentale, les tissus provenant des trois feuillets embryonnaires peuvent donner lieu à la formation d'inclusions.

Les auteurs ont pu également mettre en évidence des inclusions moins nombreuses et plus petites il est vrai, dans des fragments d'embryon de souris cultivés sans sérum, en simple suspension dans du Tyrode (méthode de Rivers).

b) Tissus adultes. — C'est après 7 jours qu'on peut observer des formations acidophiles. Elles sont situées à la périphérie du fragment, où les cellules sont encore saines d'aspect, alors que le centre est dégénéré et mal coloré. Au bout de 12 jours, ces inclusions sont encore visibles; elles ont augmenté de volume.

Les inclusions apparaissent également dans les zones de néo-croissance, mais seulement au voisinage du fragment primitif.

2. — *Dans les tissus de poulet.* — Au cours de la première culture, malgré un taux de croissance élevé du virus, les inclusions n'ont apparu qu'une fois, au 8^e jour, sous forme de minuscules granulations acidophiles. En revanche, lors des passages, l'aspect s'est révélé tout à fait comparable à celui des cultures en tissus de souris. Là encore les formations spécifiques prédominaient dans le cytoplasme des cellules épithéliales cutanées et des fibroblastes auprès du cartilage.

En conclusion, il est possible d'obtenir *in vitro* des inclusions. Mais elles apparaissent plus tardivement dans les fragments d'organes de souris explantés que chez l'animal vivant. Lorsqu'on utilise des tissus d'une espèce réfractaire (poulet) le virus survit ou même se multiplie dans la première culture sans donner d'inclusions, mais au cours des passages ultérieurs l'« adaptation » s'est faite et les inclusions apparaissent de façon constante.

Culture en plasma.

Nauck (1936) (112) cultive le virus de l'ectromélie infectieuse sur membrane chorio-allantoïque de l'œuf de poule. L'affinité du virus est alors modifiée et la souche devient pathogène pour le cobaye et le lapin, tandis que la virulence pour la souris a diminué.

Des cultures en plasma d'épithélium cornéen de lapin peuvent alors être infectées et donner lieu à la formation de lésions caractéristiques. Les passages s'effectuent en plaçant un nouvel explant à côté de l'ancien.

Les cultures étant colorées par la méthode de Mallory, le

Giemsa, ou l'hématoxyline ferrique, l'auteur décrit les lésions sous la forme d'inclusions homogènes et bien limitées, se trouvant de préférence dans la partie centrale du cytoplasme, près du noyau, très souvent entourées d'un halo; elles sont plus nettement délimitées que les corps de Guarnieri. Ces inclusions qui peuvent être deux ou plusieurs dans une même cellule, ne ressemblent en rien aux granulations normales du cytoplasme.

Les cellules atteintes sont disposées par groupes et sont surtout situées dans la partie marginale de la culture.

Les plus belles images sont données par les cultures qui ont une plage épithéliale importante, après 4 ou 5 jours par exemple, avec liquéfaction du plasma.

L'apparition des inclusions dépend en grande partie de la concentration du virus. Des doses trop fortes semblent agir trop brutalement sur la culture, provoquant la désintégration des colonies cellulaires et la nécrose rapide de leurs éléments. Au contraire une suspension suffisamment diluée donne, généralement dès le lendemain, des aspects tout à fait caractéristiques.

Conclusion.

Cette étude complète la précédente, plus générale. On doit noter qu'elle s'effectue en tissu d'animal normalement réfractaire après modification d'affinités de la souche de virus.

Il ne résulte pas de ces études de notion de cycle intra-cellulaire du virus; mais il n'a pas été employé de méthode de cultures de longue durée sans repiquages. On peut dire seulement que le virus pénètre dans les cellules en y déterminant l'apparition d'inclusions et en contribuant à activer la dégénérescence.

2° VIRUS PRODUISANT DES INCLUSIONS INTRA-NUCLÉAIRES

Nous nous limiterons, dans ce paragraphe, aux études concernant le virus de l'herpès.

VIRUS HERPÉTIQUE

Les lésions nucléaires déterminées chez l'animal par inoculation du virus herpétique ont été bien décrites par différents auteurs : Levaditi, Harvier et Nicolau (1921) (92), Lipschütz (1921) (95), Goodpasture et Teague (1923-24) (62), etc. On a évidemment cherché à reproduire les mêmes lésions en cultures de tissus. Mais les expérimentateurs se sont adressés de préférence à des tissus épithéliaux divers, puis mésenchymateux, à l'exclusion du tissu nerveux. Celui-ci est en effet assez délicat à cultiver et, bien que la preuve ait été faite de la prolifération du virus herpétique en tissu nerveux embryonnaire [Magrassi (101)], on n'y avait jamais observé jusqu'à présent la formation d'inclusions spécifiques. Ce résultat a pu être obtenu dans le service des Virus de l'Institut Pasteur en 1948. Nous allons donc présenter successivement les travaux ayant obtenu des inclusions herpétiques en culture de tissus épithéliaux et mésenchymateux, puis en tissu nerveux.

Culture en tissus épithéliaux et mésenchymateux.

Rivers, Haagen et Muckenfuss (1929) dans le travail dont nous avons parlé plus haut (p. 28) (129) ont étudié, conjointement avec le virus vaccinal, le virus herpétique.

La cornée de lapin, infectée par ce dernier virus et cultivée en plasma a présenté des altérations manifestes. L'épithélium s'épaissit, formant par endroits des monticules; les ponts intercellulaires disparaissent, les cellules augmentant de volume. Dans les noyaux apparaissent des inclusions oxyphiles typiques, tout à fait comparables à celles décrites dans les tissus d'animaux inoculés avec le virus de l'herpès.

L'année suivante, c'est à la méthode de Maitland que fait appel Andrewes pour obtenir la multiplication du virus herpétique en culture cellulaire (5). De petits fragments de tissus de lapin sont mis en suspension dans un mélange de Tyrode et de sérum de lapin, auquel on ajoute une émulsion de cerveau infectieux. Après fixation au Bouin et coloration à l'hématoxyline-éosine, les inclusions caractéristiques sont constamment retrouvées en tissu testiculaire lorsqu'il y a croissance du virus. Rares dans la première culture, elles sont constantes et nombreuses dans les passages. Elles sont toujours défaut dans les témoins.

Ce n'est qu'après 48 heures que les formations pathologiques apparaissent dans les cultures. Leur nombre augmente jusqu'au 5^e jour. La dégénérescence et la nécrose du tissu ne permettent pas de les observer plus tardivement.

Leur topographie est variable : on les rencontre aussi bien dans les cellules de l'épithélium germinale que dans l'épithélium épithéliale et les cellules interstitielles. Lorsqu'un canalicule est atteint, toutes ses cellules sont en général altérées. Fréquemment les lésions sont celles du début, correspondant au premier stade décrit par Goodpasture (62) : le nucléole s'altère, le noyau se colore en violet homogène; la membrane nucléaire s'épaissit et devient irrégulière. Mais en même temps quelques cellules présentent déjà l'aspect décrit dans le deuxième stade de Goodpasture : le noyau apparaît rempli d'une formation granuleuse oxyphile, de forme irrégulière, séparée de la membrane nucléaire épaissie par un halo clair. Ce sont les inclusions spécifiques. L'auteur note la différence avec les lésions de l'animal inoculé *in vivo* : chez ce dernier, on ne trouve les inclusions que dans les cellules interstitielles, bien que le parenchyme dégénère après quelques jours.

On peut remarquer que quelques cultures, exécutées en l'absence de sérum (milieu de Rivers), ont montré également des inclusions très nettes.

Le testicule de cobaye a aussi été employé dans les mêmes conditions; des images analogues ont apparu.

La description fournie par Akazaki (1937) (1) des lésions apparues en cornée et testicule de lapin cultivés en plasma (goutte pendante) n'est pas très différente de la précédente.

1) *Epithélium corréen*. — Les cellules lésées sont augmentées de volume; le cytoplasme devient rose pâle au Giemsa. Dans le noyau apparaissent des granulations éosinophiles, entre la basichromatine et le nucléole, prenant parfois l'aspect de réseaux estompés. Ces formations semblent augmenter aux dépens de la basichromatine qui est repoussée vers les parois du noyau. Cet ensemble

faiblement éosinophile est d'abord distribué dans l'ensemble du noyau, puis se rassemble vers le centre, laissant un vide entre la paroi nucléaire et lui. Toute la masse se résout en une ou plusieurs formations plus ou moins régulières. L'examen attentif à ce stade montre une fine structure granuleuse, parfois des granulations plus grosses et homogènes. On ne discerne plus alors ni basichromatine ni nucléole. Parallèlement à ces modifications, la membrane nucléaire s'épaissit par endroits et se fragmente.

Ces lésions cellulaires apparaissent groupées dans des zones, correspondant souvent à des lésions mécaniques de l'épithélium. Mais on les retrouve aussi dans la région de néo-croissance. Les altérations sont plus étendues après 3 jours de cultures. Les cellules sont toujours hypertrophiées, les noyaux montrant une tendance à la contraction (hyperchromatose de la paroi nucléaire). Les inclusions sont plus nombreuses, d'aspect maintenant homogène, pouvant quelquefois remplir complètement le noyau. Après 4 jours, la dégénérescence des cellules épithéliales est assez marquée, le noyau se contracte. Dans les cultures de 8 jours, enfin, il ne persiste plus d'altérations spécifiques.

2) *Tissu testiculaire.* — Les lésions portent sur l'endothélium des canalicules. Les inclusions sont granuleuses en général, parfois homogènes. Quelques altérations se rencontrent dans le tissu mésenchymateux.

Ces lésions sont très marquées au 3^e jour, lors de l'examen des cultures.

Des cultures de fragments de cœur montrent les mêmes lésions visibles parfois dès le 3^e jour et toujours après 4 jours.

D'autre part la reproduction des expériences de Rivers, Haagen et Muckenfuss a donné les mêmes résultats.

Nous voyons donc par ces différentes expériences que les inclusions intranucléaires spécifiques de l'herpès sont facilement reproduites *in vitro* en cultures d'épithélium ou de fibroblastes.

Culture en tissu nerveux.

La méthode des membranes plastiques s'étant révélée apte à la culture prolongée, sans repiquages, du tissu nerveux, a pu être utilisée pour étudier la formation des inclusions herpétiques *in vitro* dans ce tissu, ainsi que dans les tissus pulmonaire et cardiaque (13). Le tout provient d'embryon de poulet de 12 à 14 jours.

L'infection des tissus se fait à différents stades, par incubation des cultures à 37° pendant 45 minutes avec une suspension de

virus. Tous les deux jours on examine au microscope les cultures à l'état frais. Un certain nombre d'entre elles sont à chaque fois fixées au Bouin et colorées à l'hémalun-éosine, de façon à suivre l'évolution des lésions.

Les résultats ont été très concordants.

1) *Tissu cardiaque*. — Ce tissu donne une abondante croissance de fibroblastes. L'infection d'emblée n'entrave pas cette croissance; les lésions spécifiques apparaissent parfois au 2^e jour, sont présentes au 4^e jour de façon constante. Elles se trouvent dans des zones limitées à la base de la néo-croissance mais jamais à la périphérie de celle-ci.

L'infection après une semaine de culture fait apparaître en 4 jours des lésions semblables et pareillement situées.

2) *Tissu pulmonaire*. — L'infection des cultures d'une semaine, présentant une plaque épithéliale bien formée, donne régulièrement des lésions groupées en zones plus ou moins étendues. Pas plus que dans le tissu cardiaque on n'observe de généralisation des lésions à l'ensemble de la culture.

3) *Tissu nerveux* (mésencéphale d'embryon de poulet). — En dehors de toute infection ce tissu en culture est caractérisé par une évolution complexe : après une migration d'éléments nobles et de cellules gliales se produit une dégénérescence plus ou moins rapide de cet ensemble, tandis qu'apparaissent, vers le 6^e jour, de nouveaux éléments en pleine vitalité qui constituent le tissu neuro-épithélial.

L'infection d'emblée de la culture par le virus herpétique a pour effet de ralentir la migration cellulaire habituelle, puis de faire apparaître, à partir du 3^e jour, des lésions nucléaires caractéristiques bien différentes des images de dégénérescence normalement rencontrées dès ce moment dans les cultures non infectées.

Ces lésions sont disséminées dans toute la culture. Leur description correspond à celle de l'encéphalite herpétique expérimentale. Les cellules atteintes et leur noyau augmentent de taille; le cytoplasme devient plus acidophile. Dans le noyau le nucléole se fragmente jusqu'à disparaître, la basichromatine en gros débris est repoussée vers les parois du noyau dont l'intérieur se remplit d'une masse oxyphile apparemment homogène qui, au fort grossissement, montre une structure granuleuse très fine. A un stade plus avancé, on observe une contraction et fragmentation de cette masse dont le caractère acidophile va en s'accroissant. Elle se délimite par un halo qui la sépare de la paroi nucléaire : ainsi sont formées une ou deux inclusions typiques.

L'inoculation aux souris confirme la persistance du virus dans les cultures.

L'introduction du virus au 4^e jour de culture donne les mêmes lésions, l'envahissement de la culture étant au maximum : en 2 à 4 jours, la quasi-totalité des noyaux sont atteints.

L'infection des cultures âgées de 6 à 7 jours, comportant un tissu neuro-épithélial bien formé, donne des lésions limitées à certaines zones de tissu et ne se généralise pas comme précédemment. L'aspect se rapproche de celui des cultures d'épithélium pulmonaire.

Enfin, l'introduction du virus dans les cultures âgées de 14 ou 15 jours provoque en 4 jours un développement abondant de lésions, dans des zones situées aussi bien au centre qu'à la périphérie. C'est alors qu'on obtient les plus belles images d'inclusions nucléaires.

Ces expériences confirment le fait déjà établi par de nombreux auteurs, que le virus herpétique peut se développer en tissus d'embryon de poulet en y donnant des inclusions, bien que les oiseaux soient réfractaires à la maladie herpétique. Ce développement se fait aussi bien dans des tissus épithéliaux et mésenchymateux qu'en tissu nerveux.

D'autre part on peut souligner la différence de comportement vis-à-vis de l'infection entre le tissu nerveux jeune (moins d'une semaine de culture) et les autres tissus. Alors que ces derniers ne sont jamais envahis en totalité, les régions atteintes formant des îlots isolés, le virus diffuse rapidement dans toute la culture de tissu nerveux, si celui-ci est infecté d'emblée ou au 4^e jour. Plus tard, l'invasion est beaucoup plus partielle. L'explication proposée est la suivante : le réseau de fibres nerveuses présent dans les cultures contribuerait à répandre rapidement le virus en lui servant de conducteur.

Conclusion.

La culture de tissus n'a pas encore permis d'élucider le mécanisme de formation des inclusions intra-nucléaires dues au virus de l'herpès. Cependant, elle a contribué à établir quelques notions intéressantes.

Nous en soulignerons deux :

- a) Des tissus réfractaires *in vivo* permettent la croissance du virus avec formation d'inclusions spécifiques;
- b) Le comportement du virus en culture de tissu nerveux n'est pas le même que dans les autres tissus : il diffuse de façon beaucoup plus importante.

3° VIRUS NE PRODUISANT PAS D'INCLUSIONS MAIS QU'ON A PU ETUDIER A L'INTERIEUR DES CELLULES GRACE A LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Jusqu'à présent nous avons montré, pour quelques virus, les résultats obtenus par l'étude au microscope optique des lésions cellulaires en culture de tissus, que ces lésions intéressent le cytoplasme ou le noyau cellulaire. Un grand nombre de virus cependant ne déterminent pas la formation d'inclusions caractéristiques et l'on ignore le mécanisme de leur envahissement des cellules.

Les nouvelles possibilités offertes aux chercheurs par le microscope électronique ont permis d'étendre le domaine de visibilité des virus aussi bien à l'intérieur des cellules qu'en suspensions pures.

Claude, Porter et Pickels en 1947 (34) ont étudié ainsi, à l'aide du microscope électronique, des cellules tumorales de poulet en culture (tumeur n° 1, connue sous le nom de sarcome de Rous, et tumeur n° 10). Ils y ont décelé des formations qui leur paraissent correspondre au virus lui-même.

La technique employée est celle de Porter, Claude et Fullam dont nous avons parlé au chapitre premier (126). Les cultures se font sur des lames de verre recouvertes d'une pellicule de matière plastique, et logées dans des flacons; ceux-ci sont à leur tour disposés dans un appareil à tubes roulants. Les cellules adhèrent à la membrane dont les fragments intéressants sont découpés et transportés sur la grille ou le diaphragme porte-objet du microscope électronique, après fixation aux vapeurs d'anhydride ou à l'acide osmique.

Les tissus en culture ont l'aspect habituel des cellules tumorales *in vitro*. On y trouve deux types de cellules en général, fibroblastes et macrophages, avec des formes dégénérées et des cellules géantes.

Les cellules présentent des mitoses atypiques et multipolaires, divisions irrégulières et augmentation de basophilie du cytoplasme.

La photographie électronique révèle qu'outre les inclusions habituelles des cellules normales, corps de Golgi, globules graisseux, mitochondries, et les constituants de la substance fondamentale du cytoplasme, les cellules tumorales contiennent des éléments particuliers.

Dans le cas de la « tumeur 10 » du poulet, on voit des amas de densité plus élevée, de forme et de dimensions variables, formations qui n'ont jamais été rencontrées dans les cellules normales.

CELLULES TUMORALES EN CULTURE
SUR MEMBRANES PLASTIQUES

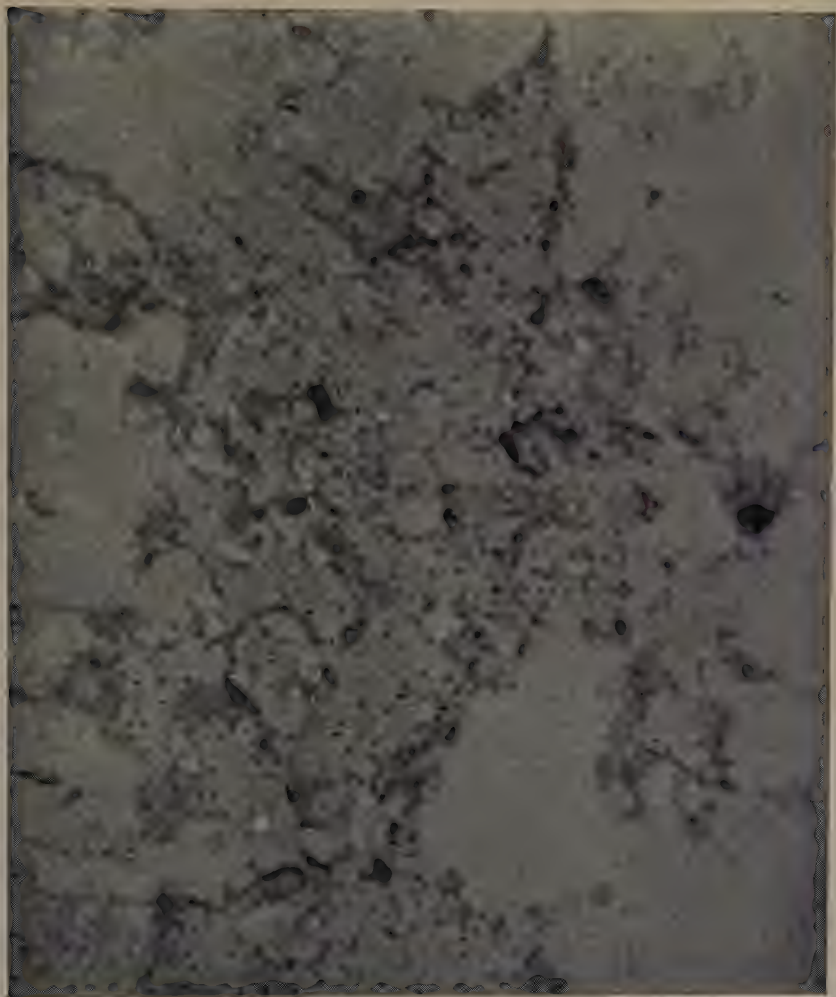


Figure 5. — Fragment de cellule provenant d'une culture de 14 jours d'une tumeur de poulet (tumeur I). Les petits éléments foncés, arrondis, isolés ou groupés par paires, représentent l'agent transmissible de la tumeur. Microscope électronique (grossissement 6.500).

Photographie publiée dans le *Cancer Research* et obligeamment communiquée par le Professeur Claude.



Figure 6. — Culture de 13 jours d'une autre tumeur de poulet (tumeur 10). On distingue à l'intérieur de la cellule, outre les éléments constitutifs normaux, des amas ponctués constitués par des agglomérats de virus.

Photographie publiée dans le *Cancer Research* et obligeamment communiquée par le Professeur Claude.

Ces amas sont formés par l'agglomération de petits éléments ronds, égaux, semblables, en beaucoup plus petit, à des staphylocoques (diamètre : 60 à 70 $m\mu$). Il semble bien que chaque amas résulte de la croissance et la subdivision des éléments constitutifs.

Les auteurs concluent que la présence de corpuscules de cette taille dans les cellules de la tumeur 10, à l'exclusion de toutes les autres, et leur disposition en colonies, tout à fait typique, permettent de penser qu'il s'agit bien là de l'agent transmissible de la tumeur.

Pour la tumeur 1 du poulet, le trait caractéristique est la présence de nombreux corpuscules bien visibles le long du bord de la cellule, simples, ou souvent disposés par paires, quelquefois par groupes de 4 ou 6, disposition caractéristique. Ces corpuscules mesurent environ 70 à 80 $m\mu$ de diamètre. Il semble qu'ils soient aptes à se diviser, car le nombre de corpuscules groupés par paire est relativement élevé, et ces éléments sont d'un diamètre inférieur aux autres, d'environ 20 %, ce qui correspond effectivement à une division de volume en deux parties égales.

Les formations ainsi décrites dans l'un et l'autre cas correspondent à peu près pour la taille, aux dimensions données par l'ultra-filtration et l'ultra-centrifugation. Il est impossible de dire s'il se trouve des éléments dans le noyau, ou dans la région du centrosphère, en raison de l'épaisseur de la cellule. Quelques-uns sont visibles dans des mitochondries en désintégration. Enfin l'aspect obtenu au microscope électronique permet de bien distinguer ces corpuscules des microsomes, éléments constitutants normaux de la substance fondamentale cytoplasmique, de même taille approximative, et que la centrifugation différentielle réunit. En effet, ces derniers sont des formations sphériques claires alors que les corpuscules pathologiques sont denses et opaques.

Ces données récentes sont intéressantes, et tout porte à croire que la microscopie électronique, qui n'en est encore qu'à ses débuts, permettra dans nombre de cas une meilleure connaissance des virus par leur examen à l'intérieur des cellules qu'ils parasitent.

CONCLUSION GENERALE DU CHAPITRE

La culture de tissus se prête parfaitement à l'étude des lésions histologiques et du comportement des virus à l'intérieur des cellules. Bien qu'un grand nombre de méthodes aient été employées on a pu remarquer que les expériences ayant donné les résultats les plus intéressants faisaient appel à des techniques spéciales (tubes roulants, membranes plastiques, etc.) adaptées à un but précis. C'est pourquoi on ne peut décrire une méthode générale de culture pour l'étude histo-pathologique : la meilleure solution est à trouver dans chaque cas particulier.

CHAPITRE III

Etudes immunologiques

L'application des cultures de tissus à des études immunologiques date du début de la méthode (Carrel et Ingebrigtsen 1912) (31). C'est Edna Steinhardt et R. A. Lambert, ceux-là mêmes qui ont été les premiers à utiliser cette méthode pour la culture des virus, qui ont dès 1914 inauguré les études immunologiques sur un virus *in vitro* (157).

Le virus vaccinal a fait l'objet des premiers et des plus nombreux travaux dans le cadre des études immunologiques en culture de tissus. Nous allons donc en premier lieu les passer en revue; nous verrons les conclusions qui peuvent s'en dégager, puis nous envisagerons les travaux ayant trait à d'autres virus et les rapprochements qui s'imposent.

VIRUS VACCINAL

Les expériences de Edna Steinhardt et Lambert (157) consistaient dans la culture de cornée en plasma, le tout provenant d'un lapin immunisé deux semaines auparavant. Malgré une excellente croissance épithéliale, le virus ne se multiplie pas. Edna Steinhardt-Harde (69) poursuit cette étude en analysant les facteurs de cette inhibition. Plaçant des cornées normales en plasma immun, et réciproquement des cornées d'animal immunisé en plasma normal, elle constate que l'inactivation du virus, totale lorsque plasma et cornée sont immuns l'un et l'autre, est moins complète en cornée normale-plasma immun, et encore moins en cornée immune-plasma normal.

C'est le testicule de lapin qui est cultivé en 1929 par Nye et Parker (117) en plasma normal, additionné de sérum de veau normal, ou hyperimmunisé, provenant d'ailleurs du même animal avant et après sa vaccination. L'effet inhibiteur du sérum immun hétérologue est manifeste.

Rivers, Haagen et Muckenfuss (1929) (130) reprennent l'étude sur les cornées de lapin. Ils obtiennent les résultats suivants :

a) Des cornées normales sont infectées, soit *in vivo* par scarifications de la cornée de l'animal vivant, soit *in vitro* par immersion pendant 1 à 3 heures des fragments de l'organe dans une suspension de virus. Mises en culture dans du plasma anti, ces cornées montrent cependant des lésions typiques (corps de Guarnieri) et le virus peut être mis en évidence dans les cultures après 24 à 48 heures.

b) Des cornées provenant d'animaux immuns, infectées *in vitro* de la même façon, ne présentent que très peu, voire même pas du tout de lésions, qu'elles aient été cultivées en plasma normal ou anti. On y retrouve le virus après 48 heures mais en quantités faibles (en plasma normal) ou très faibles (plasma anti).

Il faut remarquer que ces expériences ne durent pas plus de 48 heures. Le virus, mis en contact avec les cellules normales avant l'introduction du plasma anti, y pénètre et donne des lésions typiques. Cette notion sera confirmée au cours de nombreuses expériences ultérieures et c'est l'une des mieux établies.

Les cellules immunes, d'autre part, ne présentent pas de lésions typiques après 48 heures mais le virus n'y est pas détruit. Les substances protectrices contre le virus ne sont donc pas nécessairement virulicides.

Divers tissus sont employés par Stoel (1931) (158) qui utilise la méthode de Borrel. L'auteur confirme que, dans les cultures en plasma immun, le virus ne se développe pas, à moins qu'on n'ait laissé le virus en contact avec les cellules pendant au moins 15 minutes à 37°, avant d'introduire le plasma. Quant aux cultures en tissus immuns, les résultats dépendent de la nature du tissu. La rate de lapin, même soigneusement lavée, ne permet pas la multiplication du virus. Le testicule de lapin, en revanche, mis en présence d'une dose assez forte de virus, permet d'obtenir après quelques jours un bon accroissement de celui-ci.

L'auteur conclut qu'il existe une immunité anti-vaccinale humorale et cellulaire, cette dernière semblant liée à la présence des cellules du système réticulo-endothélial, abondantes dans les fragments de rate.

Rous, McMaster et Hudack, en 1933-1934 (134) et en 1935 (135) établissent de façon absolue le fait que les virus de la vaccine et du papillome de Shope pénètrent dans les cellules vivantes. Ayant obtenu des cultures de tissus embryonnaires de lapin dans un fin caillot plasmatique, ils libèrent les cellules par digestion trypsique. La suspension pure ainsi obtenue est mise en contact avec le virus, puis centrifugée et lavée avec soin. Les cellules pures sont alors inoculées au lapin. La preuve qu'elles ont fixé le virus est fournie par le résultat constamment positif de ces inoculations. Il est à remarquer que des cellules mortes donnent des résultats parfois aussi importants. Mais la différence essentielle réside dans le fait que l'incubation *in vitro* avec du sérum immun, suivie de lavages répétés, neutralise le virus fixé par les cellules mortes qui ne donnent plus de lésions à la peau du lapin; alors qu'au contraire, avec des cellules vivantes, le même traitement n'empêche nullement les lésions d'apparaître par la suite. Le résultat est le même lorsqu'on opère avec des cellules provenant d'organes infectés et de ce fait contenant le virus.

Les expériences de Sabin (1935) (136) sur les virus de la vaccine et de la pseudo-rage (maladie d'Aujeszki), sont effectuées en milieu de Maitland, fragments de testicule de jeune lapin en suspension dans du sérum immun ou normal dilué. Après incubation de durée variable, les différents constituants sont séparés les uns des autres. Une centrifugation légère sépare le tissu du milieu liquide. Le lavage élimine le virus ou le sérum du tissu, auquel ceux-ci n'adhèrent pas fortement. Enfin la centrifugation de la fraction liquide à 14.000 t/mn pendant 3 heures dissocie le virus et les substances protectrices (que l'auteur a dessein de nommer pas anticorps).

La présence du virus est démontrée par l'inoculation aux animaux; la preuve de l'infection du tissu est faite par l'observation de la multiplication du virus, l'apparition d'inclusions spécifiques, ou les deux phénomènes réunis.

Les principales conclusions de ces travaux sont les suivantes :

Dans les cultures protégées par le sérum immun, c'est-à-dire dans lesquelles le tissu résiste à l'infection, le virus n'est pas détruit, car il est possible de le « récupérer » par séparation d'avec le sérum, et de l'utiliser pour une nouvelle infection. Dans ces cultures, le virus peut d'ailleurs être fixé par le tissu au même degré que dans les cultures en sérum normal, mais il ne peut ni se multiplier ni provoquer de lésions cellulaires.

D'autre part, des tissus mis en contact avec du sérum immun, puis lavés de façon à éliminer toute substance non fixée par eux, restent réfractaires au virus. C'est-à-dire qu'ils ne permettent pas

à ce virus de se multiplier. Néanmoins, ils en fixent une partie, car ils peuvent ensuite transmettre l'infection à des tissus neufs.

L'action des substances protectrices s'exerce donc sur le tissu et non directement sur le virus. Le sérum confère au tissu un état réfractaire à l'infection, et le rend impropre à la multiplication du virus. Cet état n'est pas définitif, et après des lavages répétés la culture du virus est de nouveau possible.

Le tissu peut donc fixer ou absorber :

soit le virus,

soit les substances protectrices.

Si le virus est fixé le premier, l'absorption des substances protectrices est sans effet.

Si au contraire ce sont les substances protectrices qui sont fixées d'abord, ou même en même temps, le virus ne se multiplie pas.

Ces conceptions de l'auteur diffèrent notablement des conceptions classiques, et ont été critiquées surtout en ce qui concerne la liaison tissu-substances protectrices.

Cependant, Magrassi et Hallauer en 1936 (102) ont pleinement confirmé ces expériences et les ont étendues à d'autres tissus : tels le rein et la rate, qui permettent la multiplication du virus en sérum normal, ou le foie et le cerveau, dans lesquels le virus survit sans proliférer.

Voici leurs conclusions :

L'ultra-centrifugation (16.000 t/mn pendant 3 heures) permet de récupérer le virus à partir d'un mélange virus-sérum immun, en quantités cependant inférieures à celles d'un mélange virus-sérum normal.

La fixation du virus aux tissus semble aussi grande en présence de sérum immun qu'en présence de sérum normal.

L'effet protecteur du sérum anti semble dû à sa fixation préalable au tissu. Des cellules ayant fixé des anticorps ne permettent plus la multiplication du virus, ni la formation de lésions cellulaires, sans d'ailleurs que le virus soit pour cela immédiatement détruit.

Le devenir du virus fixé aux cellules protégées par les anticorps est différent suivant le tissu dont il s'agit. Dans le cas de tissu splénique, le virus disparaît rapidement. Dans le cas du testicule, il se conserve dans les cultures pendant plusieurs jours.

Enfin les auteurs font ressortir l'analogie de ce comportement avec le temps que mettent *in vivo* les divers organes à perdre leur pouvoir infectant chez un animal qui subit une infection vaccinale.

On voit donc que ces expériences confirment et étendent celles de Sabin. Sans vouloir trancher la question difficile de la liaison

virus-anticorps, on peut considérer comme démontré qu'en culture le virus vaccinal n'est pas détruit par le sérum, résultat déjà suggéré par Rivers, Haagen et Muckenfuss pour le plasma anti. Il semble en outre que les tissus puissent fixer les anticorps, devenant ainsi réfractaires à l'infection.

Galli (1937) (57) réalise des cultures en milieu de Maitland de fragments d'organes de lapin ayant reçu la vaccine. Ces tissus, en état d'infection latente, sont surinfectés en culture. Les expériences montrent que la fixation du virus est alors sensiblement égale à celle des tissus normaux, quelle que soit la phase où le tissu soit prélevé. Le comportement ultérieur du virus, après incubation à l'étuve, est différent suivant le tissu.

En testicule, le virus se multiplie (surtout si le tissu a été prélevé à la première phase de l'infection latente) ou au moins se conserve, son titre restant constant.

En tissu splénique au contraire, le taux du virus diminue notablement, quelquefois même jusqu'à la disparition.

Ces résultats confirment ceux de Stoel (158) et concordent également avec ceux de Magrassi et Hallauer (102), qui n'ont pas été établis dans les mêmes conditions.

Vieuchange et Stamatini (1938) (167) étudient les facteurs de dissociation du « mélange » virus-sérum immun. Son inoculation en milieu de Li-Rivers permet de lui redonner une faible virulence. Donc la culture a dans ce milieu un pouvoir dissociant, mais beaucoup moins important que celui de la culture sur membrane chorio-allantoïque d'œuf de poule. L'année suivante (168) les mêmes auteurs mettent en évidence l'identité des résultats, lorsqu'on introduit dans le milieu de culture soit le mélange neutre, soit le sérum d'abord et le virus 30 minutes ou 2 heures après. En revanche, la multiplication du virus est plus importante si on inocule le virus en premier lieu, puis le sérum 2 heures après.

Par opposition, la membrane chorio-allantoïque se montre toujours agent dissociant beaucoup plus fort.

Les expériences Beard et Rous (1938) (14) font appel à une technique spéciale. Ces auteurs obtiennent la culture du virus vaccinal en cellules de Kupffer, recueillies par l'aimant à partir du liquide de perfusion du foie d'un lapin après injection intra-veineuse d'oxyde magnétique de fer. Les cellules sont cultivées sur papier de soie; elles poussent sur les fibres du papier, dans du sérum que l'on remplace toutes les 48 heures.

On sait que lorsqu'on mélange dans un tube à essais du virus vaccinal avec des cellules réticulo-endothéliales vivantes (cellules

de Kupffer et clasmatoctes), l'injection intra-dermique au lapin, après séjour de quelques minutes à la température du laboratoire, ne donne que peu ou pas de lésions. Ces cellules inactivent donc le virus. Or ce même virus prolifère abondamment dans les mêmes cellules mises en culture *in vitro*. Ceci prouve que de telles cellules du système réticulo-endothélial n'élaborent pas, *in vitro*, de substances anti-virus, sans qu'on puisse dire qu'il en soit de même *in vivo*.

La méthode des tubes roulants a été utilisée par Florman et Enders en 1941 (v. chapitre premier) pour leur importante étude sur la culture du virus vaccinal en leucocytes mononucléaires de lapin (48).

Le virus vaccinal, introduit dans de telles cultures, s'y multiplie; sa prolifération a été constatée pendant plus de 3 semaines. L'addition de sérum anti ne réussit pas à éliminer le virus qui disparaît temporairement sans être détruit, car on le retrouve en général dans les 3 ou 4 jours. Un mélange virus-sérum immun, ne déterminant aucune lésion à la peau du lapin, est dissocié en culture et le virus reparaît. Dans ce cas, l'infection persiste même après additions ultérieures de sérum anti. L'addition de complément ne modifie pas les résultats. Cependant, la croissance du virus est moins rapide dans les leucocytes que dans les fibroblastes. L'action de suppression temporaire de l'activité du virus exercée par le sérum anti est plus marquée en culture de mononucléaires qu'en fibroblastes.

Nous voyons donc ici encore la possibilité de cultiver le virus vaccinal en cellules du système réticulo-endothélial. Les auteurs ayant démontré que les mononucléaires peuvent héberger le virus *in vitro*, pensent que dans l'organisme ces mêmes cellules au lieu de le détruire, contribuent à le disséminer. Les phagocytes contribueraient également à entretenir l'infection latente qui suit la phase aiguë du début de l'infection.

Ce n'est en réalité qu'une hypothèse, car rien ne prouve que les leucocytes se comportent *in vivo* comme dans les cultures. Le fait qu'ils puissent *in vitro* phagocyter des particules de carmin n'implique pas nécessairement la conservation de toutes leurs fonctions.

Conclusions.

De cette série d'expériences sur l'immunologie du virus vaccinal en cultures cellulaires on peut dégager un certain nombre de conclusions. Sans entrer dans le détail des interprétations de chaque auteur sur l'ensemble de la question, interprétations par-

fois divergentes en raison de la complexité des phénomènes en cause, on peut rassembler quelques propositions correspondant à des résultats obtenus chacun par plusieurs expérimentateurs différents, ce qui leur confère une certaine valeur.

- 1) L'immunité persiste après explantation *in vitro* des organes
(Steinhardt et Lambert, 1914).
- 2) Il n'est pas nécessaire que les tissus soient eux-mêmes immuns
(Nye et Parker, 1929).
- 3) Il n'est pas nécessaire d'employer un sérum homologue
(Nye et Parker, 1929).
- 4) Le virus peut pénétrer dans les cellules et être ainsi à l'abri du plasma ou du sérum immunitaire
(Rivers, Haagen et Muckenfuss, 1929)
(Stoel, 1931)
(Rous, McMaster et Hudack, 1934 et 1935)
(Sabin, 1935)
(Florman et Enders, 1941).
- 5) Pour les tissus immunitaires, les résultats dépendent du tissu
(Stoel, 1931)
(Magrassi et Hallauer, 1936)
(Galli, 1937).
- 6) Même mortes, les cellules peuvent fixer le virus. Mais dans ce cas, elles n'ont aucun effet protecteur à l'égard du sérum
(Rous, McMaster et Hudack, 1934 et 1935).
- 7) Le virus n'est pas détruit par le sérum immunitaire, puisque le mélange des deux, qui ne détermine aucune lésion à la peau du lapin, peut être dissocié en culture
(Sabin, 1935)
(Magrassi et Hallauer, 1936)
(Vieuchange et Stamatin, 1938)
(Florman et Enders, 1941).
- 8) En présence de sérum immunitaire les tissus peuvent fixer le virus, mais ce virus ne s'y multiplie pas
(Sabin, 1935)
(Magrassi et Hallauer, 1936).
- 9) Des tissus mis en contact avec du sérum anti, puis lavés, peuvent rester réfractaires au virus. Tout se passe comme s'ils avaient fixé une certaine quantité d'éléments protecteurs du sérum
(Sabin, 1935)
(Magrassi et Hallauer, 1936).

10) La culture du virus est possible dans certaines cellules du système réticulo-endothélial

Cellules de Kupffer (Beard et Rous, 1938)

Leucocytes mononucléaires (Florman et Enders, 1941).

Tels sont les points que l'on peut considérer comme établis pour le virus vaccinal. Ils forment un ensemble cohérent qu'on serait tenté de généraliser à l'ensemble des virus. Les études immunologiques qui ont été réalisées avec d'autres virus en culture de tissus vont nous permettre de voir dans quelle mesure ces données peuvent être conservées.

AUTRES VIRUS

Nous envisagerons dans l'ordre chronologique les principaux travaux sur l'immunologie en culture de tissus, sans chercher à traiter successivement chaque virus. En effet la plupart d'entre eux n'ont été étudiés que par un seul auteur.

Des importants travaux de Fischer en 1927 sur le sarcome de Rous (47) nous pouvons dégager la notion que l'on peut cultiver *in vitro* des cellules sarcomateuses gardant leur malignité même en sérum normal hétérologue (oie, canard), en sérum immun homologue ou hétérologue (oie, canard, lapin).

Les travaux d'Andrewes en 1929 (2) sur le virus III du lapin ont donné lieu à une étude immunologique (3). L'auteur utilise la méthode en plasma conjointement avec celle de Maitland qui permettent l'une et l'autre d'obtenir une multiplication du virus et la formation d'inclusions spécifiques en tissu et plasma (ou sérum) normaux de lapin. Ces résultats peuvent se résumer ainsi :

a) La croissance du virus ne peut s'effectuer en tissu de testicule de lapin immun, cultivé en plasma ou sérum immun.

b) En tissu testiculaire normal, si le virus est introduit en même temps que le plasma ou le sérum immun, il ne survit pas plus de 3 jours et ne forme jamais d'inclusions.

L'étude en fonction du temps et de la température montre que, à 37°, il suffit que le virus soit au contact des cellules pendant 10 minutes pour s'y introduire et être à l'abri des anticorps, comme le prouve l'apparition des inclusions.

A + 6° ou à — 2°,5 le virus ne peut pas infecter les cellules, même après 5 heures de contact.

c) En tissus immuns et sérum normal, le virus se développera bien et donnera des inclusions, à condition que les tissus soient

bien lavés avant la mise en culture. Sinon, les résultats sont moins réguliers.

Le même auteur exécute en 1930 des expériences analogues avec deux autres virus, en utilisant la méthode de Mailland.

1) Virus des glandes salivaires du cobaye (4). La culture en tissus normaux et immuns donne alors les mêmes résultats positifs, pour le testicule, moins réguliers pour l'ovaire, le cerveau et les glandes salivaires, pourvu qu'on emploie du sérum normal. Si au contraire c'est du sérum immun qui est utilisé, on n'obtient jamais d'inclusions.

2) Virus herpétique (5). Les résultats sont analogues, le virus peut pénétrer dans les cellules en 30 minutes. En outre, il n'existe pas d'immunité croisée, *in vitro*, entre le virus III et celui de l'herpès.

Bien que ces différents résultats semblent montrer que l'immunité dans ces trois affections à virus soit principalement d'ordre humoral, l'auteur n'élimine pas pour autant le facteur cellulaire, notant le fait que les cellules se trouvent dans un milieu artificiel qui peut leur faire perdre les propriétés d'immunité qu'elles possédaient *in vivo*.

Il confirme d'autre part la notion déjà établie pour la vaccine (conclusion n° 4) : le virus peut pénétrer dans les cellules et s'y trouver à l'abri des anticorps du sérum.

Mais en 1932, Topacio et Hyde (165) reprennent les expériences d'Andrewes sur le virus III (méthode en plasma) et obtiennent des résultats sensiblement différents.

D'une part ils n'obtiennent pas d'inclusions mais seulement quelques altérations nucléaires non spécifiques lorsqu'ils tentent de cultiver le virus en tissu testiculaire immun et plasma normal; et ceci même si le tissu a été bien lavé et s'il est resté 1 heure en contact avec la suspension de virus.

D'autre part des tissus normaux mis en contact avec le virus pendant 1 heure et cultivés en sérum immun ne donnent jamais d'inclusions.

Ces résultats sont obtenus dans des conditions qui ne diffèrent pas essentiellement de celles d'Andrewes. Les auteurs eux-mêmes ne savent pas pourquoi les divergences sont si accusées. Sans prétendre trancher cette difficile question, on peut dire cependant que la notion de la possibilité d'infecter un tissu avant de mettre le sérum immun est bien établie, et l'on n'est pas étonné qu'Andrewes dise y avoir réussi. Quant à la culture en tissu immun, c'est une question beaucoup plus complexe et pour laquelle il n'est pas possible de conclure.

Quoi qu'il en soit, Topacio et Hyde pensent qu'il existe une immunité humorale et cellulaire, ce qui ne diffère pas essentiellement de l'opinion d'Andrewes qui n'élimine pas la théorie cellulaire malgré ses résultats de culture.

Aucun résultat nouveau n'est apporté par Kimura et Fujisawa (1932) (83), qui cultivent en plasma des tissus normaux et immuns de poumon, testicule et rein de lapin infectés par le virus variolique. Aucune croissance ne se produit en plasma immun; en tissu immun elle est fortement entravée.

Haagen, en 1933 (64) étend au virus de la fièvre jaune les notions déjà établies que le sérum immun neutralise le virus *in vitro* en présence de cellules vivantes, et que le virus, ayant pénétré dans les cellules, résiste à des sérums immuns, même concentrés, et maintient une virulence normale. Dans une seconde communication (65), il établit que cette action protectrice n'est pas exercée par des cellules mortes.

Les importants travaux de Hallauer (1934-35) (68) sur la peste aviaire font une place à l'étude de l'immunité en culture de tissus. L'auteur montre que le virus, mis en contact avec le tissu de cerveau embryonnaire pendant 4 heures avant l'introduction du sérum immun peut se développer malgré celui-ci. En outre, ce sérum immun a des propriétés opsonisantes.

Nous avons vu que Sabin (1935) (136) a expérimenté sur la vaccine et la pseudo-rage. Traub (1935) (166) cultive ce dernier virus en tissus testiculaires de cobayes immuns, en milieu de Maitland, complétant en quelque sorte les expériences de l'auteur précédent.

Les fragments de tissus sont soigneusement lavés et mis en suspension en sérum de cobaye dilué. Le virus se développe dans ces cultures, mais moins abondamment que dans les cultures-témoins, ce qui fait dire à l'auteur d'une part que les cellules elles-mêmes ne sont pas immunes, et d'autre part que le ralentissement de la croissance s'explique par le fait suivant : le lavage n'a pas pu éliminer la totalité des liquides qui contiennent les anticorps.

Dans leur travail sur l'ectromélie infectieuse (40) faisant suite à celui que nous avons décrit au chapitre II, Downie et McGaughey (1935) étudient l'action du sérum immun sur la croissance du virus en milieu de Maitland (tissus embryonnaires de souris).

Ils étendent à ce nouveau virus des notions bien établies pour d'autres :

- a) L'incubation du virus avec le tissu avant l'introduction du sérum immun est suivie d'une croissance très nette;
- b) Le sérum immun n'est pas virulicide.

En effet, l'introduction dans la culture du mélange virus-sérum immun n'est pas suivie d'une croissance immédiate, phénomène bien connu; mais si l'on attend plus de 5 jours le virus réussira quand même à se développer. Nous voyons donc que le pouvoir dissociant des cultures en tissus peut être encore appliqué dans un nouveau cas. (Il convient de signaler que les auteurs indiquent la technique d'inoculation dans la membrane chorio-allantoïque comme procédé de dissociation plus rapide.)

Jusqu'à présent, en dehors de Topacio et Hyde qui n'ont pu reproduire les expériences d'Andrewes, les différents auteurs n'ont pas abouti à des résultats discordants. Les expériences de Magill et Francis, en 1937 (98) vont donner des conclusions sensiblement différentes de celles que nous avons déjà relevées.

Il s'agit d'une souche de grippe A, la souche PR8, cultivée en tissus d'embryon de poulet en suspension dans du Tyrode, avec addition de sérums immuns de furet ou de lapin. Les résultats de ces expériences sont les suivants :

Des cellules exposées à l'action de sérum immun de titre élevé, puis lavées abondamment, permettent la croissance du virus aussi bien que les cellules traitées par le sérum normal.

Lorsqu'on ajoute le virus à la suspension de cellules avant l'addition de sérum immun de titre bas, le virus survit dans les cellules.

Si l'on introduit dans la culture le mélange virus-immunsérum de titre bas, il semble que le virus ne se multiplie pas, ou du moins peu. Mais quand on opère avec du sérum de titre élevé, le virus est toujours inactivé, que le sérum soit introduit avant ou après celui-ci.

Enfin, si le virus est mélangé à un sérum de titre élevé, en l'absence de cellules, il est réellement inactivé, car la centrifugation à grande vitesse de ce mélange ne fournit pas de virus actif, contrairement à ce qui se passe avec un mélange virus-sérum normal.

Dans la discussion des résultats, les auteurs soulignent que le virus est inactivé après incubation avec suffisamment d'anticorps au point de ne plus pouvoir être détecté même après lavages et centrifugations répétés. En présence de cellules vivantes, le virus est inactivé par un sérum immun fort, que celui-ci soit introduit le premier ou le dernier.

Les cellules traitées par le sérum immun, puis lavées, permettent bien la multiplication du virus.

Magill et Francis, notant l'opposition de ces résultats avec ceux de Sabin, concluent qu'il ne semble pas y avoir d'action directe des substances protectrices sur les cellules du tissu, mais plutôt sur le virus lui-même, l'association n'étant même pas rompue par l'ultra-centrifugation.

Nous verrons plus loin comment on peut interpréter les divergences qui se manifestent entre ces travaux et ceux de Sabin ainsi que ceux de plusieurs autres expérimentateurs. La notion que le sérum anti suffisamment concentré inactive le virus, en quelque sorte définitivement, est nouvelle, mais elle ne renverse pas les données admises jusqu'ici. La conclusion que les cellules ne fixent pas l'immunsérum est évidemment à l'opposé de celle de Sabin.

Avec Pearce qui en 1940 revient au virus III (121) apparaît la distinction entre l'immunité acquise et l'immunité naturelle.

Utilisant lui aussi la méthode de Maitland (testicule de lapin en sérums divers) il reconnaît que la culture en tissus normaux, mais avec du sérum anti, ne donne ni inclusions ni multiplication du virus. Au contraire le virus se développe bien en présence de sérums hétérologues appartenant à des animaux d'espèces naturellement réfractaires à la maladie (rat, cheval, vache, chèvre) ainsi qu'à l'homme, également réfractaire.

En revanche, la culture en tissus immuns, lavés ou non, permet, avec du sérum normal, un développement normal du virus avec formation d'inclusions. En tissus d'animaux résistants (cobaye, en sérum soit homologue, soit de cheval ou de lapin; rat, en sérum de cheval ou de lapin) le virus ne se développe pas.

On remarquera que ces travaux confirment ceux d'Andrewes que Topacio et Hyde n'avaient pu reproduire, sur la possibilité de faire croître le virus en tissus d'animaux immuns et sérum normal.

En outre l'auteur conclut que, bien que les rôles respectifs des cellules et des anticorps circulants ne soient pas encore complètement éclaircis, comme en témoigne la divergence des résultats obtenus jusqu'à présent, *le facteur humoral semble prédominant dans l'immunité acquise.*

Par opposition, en ce qui concerne les tissus des *animaux naturellement résistants*, il doit s'agir d'une *immunité cellulaire*. Le virus en effet ne s'y développe pas, même en présence de sérum normal d'une espèce sensible. Et l'absence ou le petit nombre des leucocytes et des cellules réticulo-endothéliales dans les cultures permet d'éliminer ces éléments en tant que facteurs de protection tissulaire.

Les expériences de Enders et Pearson (1941) mettent en évidence le rôle de la température dans la résistance des poulets à la grippe (44).

En effet, lorsqu'on inocule le virus grippal à des embryons de poulets *in ovo*, après l'éclosion ce virus ne peut être retrouvé chez le poussin nouveau-né. La méthode de culture de tissus en tubes roulants montre qu'à la température de 37°, le virus survit et s'accroît en tissus pulmonaires d'embryon de poulet de 18 à 20 jours, aussi bien que de poussins éclos de 2 jours. A 41°, en revanche, aucune multiplication du virus n'intervient. Le même résultat est d'ailleurs obtenu en incubant à 41° des œufs inoculés par la voie allantoïque. L'absence d'anticorps neutralisants chez le poussin ne va pas contre cette conception.

De cet ensemble de travaux sur l'immunologie des virus autres que le virus vaccinal en culture de tissus, on peut tirer des conclusions confirmant ou infirmant celles du virus vaccinal, ou bien indépendantes.

En fait, la plupart des conclusions du premier paragraphe sont confirmées. S'en écartent seulement

les résultats de Topacio et Hyde, qui n'ont pas pu cultiver le virus III en tissus immuns et plasma normal, ni en tissus normaux laissés une heure en contact avec le virus avant d'ajouter le plasma immun;

les résultats de Magill et Francis sur la grippe.

Pour ces derniers, dont les conclusions s'opposent en quelque sorte à celles de Sabin sur le virus vaccinal, on doit remarquer qu'il ne s'agit pas du même agent pathogène et que le virus grippal diffère profondément du virus vaccinal. Outre la taille (le virus vaccinal est beaucoup plus gros), on peut relever la profonde dissemblance dans les possibilités d'immunisation active : celle-ci est facile à obtenir et durable pour la vaccine, beaucoup plus difficile et passagère dans le cas de la grippe. L'homogénéité antigénique du virus vaccinal s'oppose à la diversité extrême du virus grippal. Dans ces conditions on peut admettre que le comportement de ces deux virus soit foncièrement différent, *in vitro* comme *in vivo*. Le problème de l'immunité dans les maladies à virus n'est pas unique. Les conclusions applicables à un virus ne sont pas nécessairement transposables à tous les autres.

A ceci, nous pouvons ajouter que l'immunité d'espèce semble différente de l'immunité acquise, au moins pour le virus III du lapin.

CONCLUSION GENERALE DU CHAPITRE

On peut dire que la culture de tissus appliquée à l'étude immunologique des virus a permis d'obtenir certains résultats, dont les principaux sont :

- Le virus ayant pénétré dans les cellules est à l'abri du sérum immun.
- Le mélange virus-sérum immun, inactif en apparence, peut être dissocié en culture, le virus retrouvant son pouvoir pathogène.
- La culture de certains virus est possible en cellules du système réticulo-endothélial.

Les deux premières propositions peuvent être considérées comme générales bien qu'il soit possible d'y trouver des exceptions. La troisième n'a pas encore été étendue à d'autres virus que celui de la vaccine.

Notons que la deuxième proposition sous-entend que le sérum immun n'a pas un pouvoir virulicide, notion bien établie d'ailleurs en dehors de la culture de tissus.

Quant au problème de l'origine cellulaire ou humorale de l'immunité, il a obtenu de nouveaux arguments dans l'un et l'autre sens. Vraisemblablement l'immunité doit avoir d'ailleurs une origine double. Ce qu'on peut dire, c'est que dans certains cas, l'un ou l'autre des deux mécanismes semble dominer, sans qu'on puisse lui attribuer l'exclusivité.

CHAPITRE IV

Etude des Interférences entre deux virus

L'infection d'un organisme vivant par un virus peut, dans certaines conditions, rendre cet organisme réfractaire à une nouvelle infection due à un virus différent. Cette protection temporaire, distincte de l'immunité, est généralement désignée sous le nom d'interférence.

Ce phénomène a été décrit pour la première fois par McKinney (108), à propos des virus des plantes.

Les premiers travaux relatifs aux virus animaux sont ceux de Hoskins (75) : interférence entre une souche neurotrope et une souche pantrope de virus amaril chez le singe; et ceux de Magrassi (100) : souches non encéphalitogène et encéphalitogène d'herpès chez le lapin. Dans ces deux cas, le virus inoculé le premier empêche la croissance du second.

Dans d'autres cas on a pu observer des interférences entre deux virus inoculés simultanément; l'un des virus prédomine alors et inhibe la croissance de l'autre.

Les phénomènes d'interférence *in vivo* peuvent se produire sur deux souches d'un même virus, sur deux souches antigéniquement voisines et même sur deux virus sans parenté sérologique, tels ceux de la fièvre jaune et de la fièvre de la vallée du Rift (Findlay et MacCallum) (46).

Tous les virus sont loin de donner lieu à des interférences; on a décrit à diverses reprises la présence de plusieurs types de lésions dans une même cellule, correspondant à une infection multiple. Andrewes (1940) (6) a même constaté que deux virus donnés

(le virus III et celui du Fibrome de Shope) peuvent proliférer simultanément en donnant des lésions des deux types, si on les inocule ensemble, et qu'au contraire si l'un des deux (le virus III) est introduit le premier, il peut supprimer l'action de l'autre.

Toutes ces données ont été établies par inoculation directe à l'animal. Mais la culture de tissus constitue un excellent moyen, pratique et économique, d'étude complémentaire de ces phénomènes. Aussi Andrewes en 1942, Lennette et Koprowski en 1946 ont ils exécuté d'importantes séries d'expériences sur ce sujet. D'autres travaux, utilisant l'inoculation dans l'œuf, ont été accomplis par W. et G. Henle (1943-44) (72) (73) et von Magnus (1946) (99); ils n'entrent pas dans le cadre de notre étude, et nous ne ferons que les mentionner. C'est le rôle de la culture de tissus dans l'étude des interférences que nous allons essayer de dégager.

Pour démontrer l'existence d'un phénomène d'interférences, il faut analyser l'action pathogène du produit de culture. C'est-à-dire qu'on ne peut opérer que sur des virus donnant des lésions différentes par leur nature ou leurs conditions d'apparition. Sinon il est impossible de se rendre compte dans quelle mesure un virus a inhibé l'autre.

Le principal travail d'Andrewes (7) a porté sur deux souches de virus grippal A désignées sous les appellations de « WS » et de « neuroflu ». La première donne des lésions pulmonaires à la souris par inoculation intra-nasale. La seconde est neurotrope et tue la souris par voie intra-cérébrale.

Ces deux souches ont été cultivées en milieu de Rivers (embryon de poulet finement découpé en suspension dans 4 cm³ de Tyrode) avec les résultats suivants :

a) La souche WS, mise en culture 24 heures avant la souche neuroflu, empêche la croissance de celle-ci.

Toutefois cet effet est incomplet si les doses des deux virus sont légères. De même l'interférence n'est pas totale si le second virus est ajouté peu de temps après le premier, ou si la culture du premier virus est conservée pendant 24 heures à la glacière ou à la température ordinaire, au lieu d'être mise à l'étuve.

L'auteur élimine la possibilité d'action d'un principe inhibiteur soluble dans le liquide de culture, car la souche neuroflu se développe normalement dans des cultures où le Tyrode est remplacé par l'ultrafiltrat, privé de virus, d'une culture de 24 heures de WS.

b) L'infection simultanée d'une même culture avec les deux virus a conduit à une élimination presque totale du neuroflu par

le WS, résultat différent de ceux obtenus dans une expérience antérieure, dans laquelle il n'y avait pas eu d'interférence.

c) Si maintenant on inocule le neuroflu en premier lieu, puis le WS après 24 heures, l'interférence est à peu près complète.

Dans la deuxième partie de son travail, Andrewes étudie la spécificité de l'interférence. Il s'adresse à des virus différents du point de vue sérologique.

En premier lieu la souche de virus grippal PR8 qui a encore une certaine parenté antigénique avec les souches WS et neuroflu; une interférence complète se produit avec cette dernière. Au contraire lorsqu'il s'agit de virus entièrement distincts, tels que les agents du lymphogranulome vénérien, de la peste aviaire, de la vaccine, aucune interférence ne peut être mise en évidence. Nous verrons plus loin l'interprétation de ces phénomènes.

Le travail de Lennette et Koprowski (88), plus récent et plus détaillé que le précédent, peut être présenté comme modèle du genre. Ces auteurs étudient les interférences entre quatre virus, ceux de :

- la fièvre jaune, souche Asibi et souche dite « 17 DD High » dérivant de la 17D de Theiler et Smith;
- l'encéphalite du Nil (West Nile);
- l'encéphalomyélite équine du Venezuela;
- la grippe A.

Les cultures sont effectuées en milieu de Maitland au sérum humain, sauf pour la grippe où l'on supprime le sérum en raison de la difficulté où l'on est d'obtenir du sérum humain dépourvu d'anticorps grippaux.

Pour chaque expérience d'interférence, on prépare trois flacons de milieu de culture (embryon de poulet de 8 à 10 jours privé de système nerveux central et finement découpé). Deux de ces flacons sont infectés avec 0,5 cm³ d'une suspension du premier virus, puis le tout est mis à l'étuve à 37°. Après 24 heures on ajoute, dans le troisième flacon et l'un des deux premiers, 0,5 cm³ de la suspension du deuxième virus et les cultures restent encore à l'étuve pendant deux jours, dans le cas du virus grippal, pendant trois jours pour les autres virus. Dans certains cas on a utilisé des séries de cultures avec des doses décroissantes du second virus. Le titrage final des virus s'effectue sur souris; la voie intra-nasale étant réservée à la grippe, la voie intra-cérébrale utilisée dans les autres cas.

Le problème de la différenciation des lésions causées à l'animal

a été résolu de façon particulière suivant les cas. Le tropisme tissulaire distinct, comme dans le cas de grippe et fièvre jaune, est un moyen commode (celui d'ailleurs qu'a utilisé Andrewes). La distinction entre grippe et encéphalite du Nil, les deux virus correspondants étant pathogènes par voie nasale, s'effectue chez la souris par l'aspect différent des lésions pulmonaires, et chez l'embryon de poulet par la faculté qu'a le virus grippal de fournir des agglutinines pour les hématies de poulet. Quant aux virus neurotropes, ils se distinguent entre eux par la différence de pouvoir pathogène pour des souris jeunes ou plus âgées, inoculées par voie extra-neurale. Mais cette méthode ne peut servir que dans un sens, lorsque le virus le moins pathogène est mis en culture le premier. Les auteurs n'ont pu trouver aucun moyen permettant d'étudier l'interférence inverse.

Les résultats de ces expériences sont résumés ainsi qu'il suit :

1) La souche « 17DD High » de la fièvre jaune est capable de supprimer complètement la croissance aussi bien de la souche Asibi du même virus que du virus hétérologue de l'encéphalite du Nil, même lorsque ces derniers sont ajoutés aux cultures en grandes quantités.

2) La souche « 17DD High » et le virus de l'encéphalite du Nil produisent l'arrêt, total ou partiel, de la croissance du virus de l'encéphalomyélite du Venezuela, suivant la quantité de ce dernier qu'on a introduite dans les cultures. Les interférences réciproques n'ont pu être étudiées, pour le motif que nous venons de voir.

3) La souche « 17DD High » et le virus de l'encéphalite du Nil sont capables de supprimer complètement, ou presque, la croissance du virus grippal A (souche PR8). Les interférences dans le sens opposé ont été étudiées, mais leur existence n'a pu être démontrée dans les conditions de l'expérience.

4) Des expériences ont été faites pour rechercher la présence éventuelle d'anticorps neutralisants ou de substances non spécifiques dans les cultures infectées avec la souche « 17DD High ». Elles n'ont donné aucun résultat positif.

Conclusion.

L'ensemble de ces expériences prouve que par la méthode de Maitland ou de Rivers, la culture de tissus se prête bien à l'étude des interférences. Ce sont ces méthodes qui ont été employées, parce que, malgré leur simplicité, elles permettent d'obtenir une quantité importante de virus. Rien n'empêcherait d'ailleurs d'utili-

liser d'autres méthodes; une étude histologique, par exemple, permettrait une différenciation sans avoir recours à l'inoculation aux animaux.

Quoi qu'il en soit, quelques éléments ont été apportés, dans l'étude de ce problème complexe, par la culture de tissus.

1) Andrewes, comme Lennette et Koprowski sont d'accord pour éliminer, dans les phénomènes d'interférences, l'action de substances solubles, spécifiques ou non, qui seraient produites par le premier virus. Le phénomène est distinct de l'immunité.

Il ne s'agit pas non plus de simples modifications de pH.

2) La possibilité d'interférences entre virus antigéniquement distincts, déjà démontrée *in vivo*, est confirmée *in vitro*, soit que ces virus aient le même tropisme tissulaire (fièvre jaune, et encéphalite du Nil ou encéphalomyélite équine du Venezuela) soit qu'au contraire les tropismes soient différents (encéphalite du Nil ou fièvre jaune et grippe A).

3) Les interférences sont un phénomène « vivant ». Les cellules sont peut-être altérées, mais non pas tuées.

Il faut cependant remarquer que les conditions d'interférences peuvent être différentes en culture de tissus et chez l'animal. Andrewes lui-même n'est pas certain qu'il s'agisse toujours du même mécanisme dans les différents phénomènes d'interférence (8).

Les données sont encore insuffisantes pour conclure définitivement. L'hypothèse d'Andrewes, que le premier virus, « bloquant » un élément de nutrition indispensable au second, empêche ainsi sa croissance, est très vraisemblable.

Il est possible que la culture de tissus permette d'obtenir de nouveaux éléments de solution, tel que celui-ci : le siège du phénomène est-il à l'intérieur ou à la surface des cellules?

Une application pratique du phénomène d'interférences en culture de tissus est son utilisation au titrage de virus *in vitro* (Huang, 1943) comme nous le verrons au chapitre V.

CHAPITRE V

Isolement et titrages des virus

ISOLEMENT

Il est apparu que la culture de tissus pouvait être dans certains cas un moyen plus sensible que l'inoculation à l'animal pour déceler de faibles doses de virus.

En 1936, Cox (36), cultivant par la méthode de Rivers le virus de l'encéphalomyélite équine (souche Est), constate que des doses très faibles de virus (dilutions d'une suspension de cerveau de souris infectée) peuvent être le point de départ de cultures dont le liquide surnageant tue la souris ou le cobaye. Les mêmes doses, directement inoculées, sont sans effet sur les animaux.

De même pour l'encéphalite japonaise : Kawakita (1939) (82) réalise la culture de ce virus dans un milieu spécial dérivé de la méthode de Maitland (cerveau d'embryon de poulet finement découpé, en suspension dans du liquide allantoïque d'œuf de poule), puis en Maitland proprement dit. Ces procédés se révèlent au moins aussi sensibles que l'inoculation aux souris pour des doses minimales de virus.

L'isolement de l'agent du lymphogranulome vénérien (maladie de Nicolas et Favre) à partir du liquide de lavage conjonctival filtré a été réalisé en 1940 par W. Curth, H. Curth-Ollendorff et M. Sanders (37), par la culture en milieu de Maitland modifié (cerveau d'embryon de cobaye, sérum cordon-placentaire et solution physiologique). Après une semaine, l'inoculation du liquide de culture à des souris leur confère une lymphogranulomatose typique, alors que l'inoculation directe du lavage conjonctival n'avait rien donné.

La même année, Pang et Zia, à la suite de leurs expériences de culture du virus de l'encéphalite de Saint-Louis sur gélose-

tissu (118), concluent à la sensibilité de cette méthode, égale à celle de l'inoculation à la souris, et la préconisent pour l'isolement direct du virus à partir de produits pathologiques provenant du malade (*).

Ces quelques exemples montrent que l'on peut, dans certains cas, avoir recours aux différentes méthodes de cultures cellulaires pour isoler un virus. Il peut s'agir d'expériences sur un virus connu, qu'on désire mettre en évidence dans une suspension très pauvre, comme c'était le cas plus haut. Mais aussi le même procédé peut être utilisé pour tenter d'isoler un virus encore inconnu. Les expériences de Broadhurst et ses collaborateurs, qui obtiennent dans des cultures en série des inclusions qui semblent caractéristiques, d'abord sur la rougeole (22), puis sur la scarlatine (21), n'aboutissent pas à l'isolement d'un virus nouveau.

Il en est de même des travaux de Grand (1944) (63) qui cultive des ganglions lymphatiques de malades atteints de la maladie de Hodgkin et obtient *in vitro* des formations pathologiques transmissibles en série *in vitro* et *in ovo*.

En revanche, Plotz, en 1938 (124), obtient la culture du virus de la rougeole à partir du sang d'un malade qu'il ensemence dans un milieu spécial : suspension de cellules d'embryon de poulet en sérum dilué avec du Tyrode, plus quelques gouttes de plasma de poule. En effet, après 10 passages en série (dilution 7-10), l'injection au singe de 5 cm³ de culture provoque chez cet animal une rougeole intense caractéristique.

Ce travail est confirmé en 1941 par Rake, Shaffer et Jones (127) qui, partant cette fois de produits de lavage naso-pharyngés de rougeoleux inoculés dans un milieu semblable, reproduisent également la rougeole chez le singe au bout de plusieurs passages et adaptent le virus à la membrane chorio-allantoïque de l'œuf de poule. Il semble donc qu'on puisse parler ici d'isolement d'un nouveau virus à l'aide des cultures cellulaires.

Sanders, en 1942 (139), isole le virus de la kérato-conjonctivite épidémique, à partir du produit de râclément de la conjonctive malade. Après deux passages sur cerveau de souris *in vivo*, et dans l'impossibilité de maintenir l'infection par ce procédé, l'auteur inocule des cultures (tissu cérébral d'embryon de souris en sérum ultrafiltré) et réalise treize passages en maintenant les cultures à la température du laboratoire. Le virus, ayant ainsi atteint un titre

(*) Signalons que le virus grippal a pu être isolé directement en culture de tissus par Francis et Magill (1937) (53) et Nigg, Wilson et Crowley en 1941 (115). Mais la méthode d'isolement dans l'œuf de poule a donné de meilleurs résultats.

suffisant, peut être retransmis à la souris par inoculation intracérébrale; entretenu de cette façon, il provoque la mort de l'animal au bout de quelque temps.

Voici donc encore un cas où c'est la culture de tissus qui a permis l'isolement d'un nouveau virus.

On peut penser que dans l'avenir ce procédé général rendra encore des services de cet ordre.

Il convient de signaler les milieux de culture « portatifs » mis au point par Sanders et ses collaborateurs (141) (140), consistant en petits tubes à essais contenant des fragments de tissus embryonnaires en suspension dans du sérum ultrafiltré. Ces milieux, destinés à être ensemencés avec des produits pathologiques ou des insectes dont on veut déterminer le rôle de vecteur dans certaines maladies à virus, conservent plusieurs semaines leur vitalité sans précautions particulières, si les conditions de pH, choix du tissu, rapport tissu/milieu sont convenables. Ils contiennent à titre de bactériostatique une certaine quantité de sulfamides. Nous verrons au chapitre VII que la pénicilline et la streptomycine résolvent beaucoup mieux le problème des contaminations bactériennes.

TITRAGE

La possibilité d'utiliser la culture de tissus pour titrer *in vitro* des suspensions de virus est une conséquence de la sensibilité de cette méthode. La première réalisation a été faite en 1941 par Yanamura et Meyer (179). Se basant sur le fait, constaté dans leurs expériences sur la psittacose (v. chapitre II), que la dilution du virus qui infecte la culture au départ détermine étroitement l'allure de la courbe de croissance, ces auteurs font observer qu'on peut utiliser ce moyen pour titrer le virus. Des expériences comparatives avec le titrage par inoculation à la souris montrent un parallélisme frappant. Mais il est indispensable d'observer l'asepsie la plus stricte pour avoir des résultats valables.

Les travaux de Huang (1942, 1943) réalisent une étude méthodique du titrage et de la neutralisation de quelques virus en culture tissulaire.

Partant de la culture du virus de l'encéphalomyélite équine (souche Ouest), il met au point une méthode dont le principe réside dans le fait qu'un tissu ne pousse pas quand son infection par ce virus est trop forte (76).

Méthode. — On prépare une série de tubes de culture en mettant dans chacun d'eux une dizaine de fragments de muscle strié

d'embryon de poulet de 9 jours en suspension dans 1 cm³ de sérum ultrafiltré dilué dans une solution physiologique tamponnée (méthode de Sanders, voir chapitre premier). Dans chaque tube est ajouté une goutte des différentes dilutions décimales du virus.

Après 48 heures d'étuve à 37°,5 chaque fragment est transféré en micro-culture sur lame dans une goutte de plasma ou en boîte de Carrel. Le tout est remis à l'étuve pour la même durée, puis examiné au microscope, à un faible grossissement.

Résultats. — Les résultats ont été constants. Les fragments infectés par le virus n'ont montré dans ces conditions aucune croissance, tandis qu'une nappe de fibroblastes s'étendait autour de ceux où la quantité de virus était trop faible pour agir sur la croissance cellulaire.

Une variante de la même méthode a été également utilisée (77). Elle s'appuie sur l'observation de A. Fischer, que lorsque deux fragments de tissus en culture sont explantés et disposés dans un tube contenant une solution physiologique, ils s'unissent par leur croissance en une masse sphérique unique.

La même technique que ci-dessus est utilisée, mais après la première incubation, au lieu de transférer les fragments en plasma, on les dispose par deux dans un petit tube contenant une goutte d'extraît embryonnaire et deux gouttes de sérum ultrafiltré dilué; ces derniers tubes sont mis à l'étuve pendant 36 heures. La lecture est facile : s'il y a coalescence des deux fragments, c'est que la culture ne contenait pas de virus; sinon, la présence du virus est assurée.

Cette méthode, suivant l'une ou l'autre technique, s'est révélée au moins aussi sensible et tout aussi fidèle que le titrage sur souris.

Le principe même sur lequel est basé la méthode que nous venons de décrire est valable dans des conditions définies : culture du virus de l'encéphalomyélite équine (souche Ouest) en tissu musculaire d'embryon de poulet. L'auteur fait remarquer lui-même que ce principe ne saurait être généralisé, puisque Feller, Enders et Weller (45) notent que l'infection par le virus vaccinal ne modifie pas de façon appréciable la croissance des cellules d'embryon de poulet cultivées en tubes roulants.

Pour étendre la possibilité de titrage à d'autres virus, Huang (78) fait appel à des phénomènes d'interférence.

Ce sont les virus de l'encéphalite de Saint-Louis et de la poliomyélite murine de Jungeblut et Sanders qui sont étudiés de cette façon.

Ces virus sont cultivés suivant des dilutions décimales dans un milieu liquide analogue au précédent, mais où le tissu musculaire

d'embryon de poulet est remplacé par du cerveau de souris embryonnaire. Après une incubation variable, 4 jours pour le virus poliomyélique et 6 jours pour celui de l'encéphalite de Saint-Louis, on introduit dans les cultures une goutte de suspension de virus de l'encéphalomyélite équine (souche Ouest) et on remet à l'étuve.

Dans les tubes où le tissu cérébral d'embryon de souris a servi de support à la culture du virus de Saint-Louis ou du virus de la poliomyélite murine, la croissance de l'agent de l'encéphalomyélite équine n'a pas lieu et ce virus disparaît rapidement. Au contraire dans les tubes où il n'y a pas eu une quantité suffisante du premier virus pour donner lieu à une prolifération, le virus surajouté trouve le chemin libre et se développe abondamment. Après 48 heures on le titrera comme dans la première expérience. Une goutte du liquide surnageant de chacun des tubes est ajoutée à un des tubes d'une nouvelle série, à base de muscle strié d'embryon de poulet, qui est mise à l'étuve. Après deux jours, on transfère les fragments en gouttes de plasma séparées dans des boîtes de Carrel, la lecture se faisant le lendemain au microscope. Ici, bien entendu, la croissance cellulaire indique la présence et non plus l'absence du virus que l'on désire titrer.

La sensibilité de cette deuxième méthode s'est révélée égale à celle de l'inoculation directe à la souris. Cependant, comme elle est compliquée et qu'elle comporte des risques d'erreurs, l'auteur a cherché à en établir une nouvelle, plus simple et plus sûre. Il y est parvenu en utilisant le fait d'observation que le catabolisme des tissus infectés produit une bien moins grande quantité de produits acides que celui des tissus sains. Le pH s'abaisse donc moins rapidement si le virus est présent.

Cette troisième méthode, très simple, a été utilisée pour les virus de l'encéphalomyélite équine (souche Ouest), de l'encéphalite de Saint-Louis et de la poliomyélite (souche murine) (79). On établit des séries de tubes contenant des fragments de tissu embryonnaire finement découpé (muscle de poulet pour l'encéphalomyélite équine et cerveau de souris pour les deux autres virus) (15 à 20 fragments dans 1,5 cm³ de sérum ultrafiltré dilué) puis on infecte les tubes avec les différentes dilutions de virus. La durée d'incubation est de 2 à 3 jours sauf pour l'encéphalite de Saint-Louis où elle est prolongée pendant 6 à 7 jours. Puis, pour que les changements de pH soient le plus net possible, on substitue au liquide surnageant, fortement tamponné, une solution de Ringer modifiée, avec 0,1 g de glucose et 0,005 g de rouge de phénol pour 100 cm³. Les fragments de tissus sont lavés deux fois puis mis en suspension dans 0,3 cm³ de ce milieu, dans un flacon dessiccateur où l'on fait le vide avec une trompe à eau pendant 1 heure. Après 2 ou 3 heures

d'étuve on peut faire la lecture : les tubes où le virus a poussé sont restés rouges, les autres sont devenus jaunes.

Au terme de ces expériences, l'auteur en arrive aux conclusions suivantes :

1) La méthode de culture de tissus permet le titrage des virus de l'encéphalomyélite des équidés, souche Ouest.

2) Ses avantages sur la méthode classique de titrage *in vitro* sont les suivants :

- Simplicité, rapidité et coût moins élevé (un seul embryon de poulet suffit pour toute une expérience).
- Elimination du facteur individuel inhérent à l'animal.
- Plus grande sensibilité, en général.

Il convient de noter qu'en culture de tissus on opère sur le simple mélange tissu-virus, alors qu'*in vivo* intervient l'immunité naturelle. En outre on peut introduire dans la culture la quantité de suspension virulente que l'on veut, tandis qu'une souris ne peut recevoir par voie intra-cérébrale plus de 0,03 à 0,05 cm³.

3) Des résultats semblables doivent pouvoir être obtenus avec d'autres virus :

- | | |
|-------------------------|--|
| — sur embryon de poulet | { peste aviaire
maladie de Newcastle |
| — sur embryon de souris | { encéphalite japonaise
chorioméningite lymphocytaire
kérato-conjonctivite aiguë |
| — en tissu humain | { rougeole
variole aviaire
trachome |

Enfin l'auteur préconise l'emploi de sulfadiazine pour éviter les contaminations secondaires.

CONCLUSION

Ces travaux sont d'un intérêt indiscutable : ils prouvent la possibilité d'utiliser commodément la culture de tissus au titrage de certains virus. Malheureusement cette méthode ne peut être généralisée : nombre de virus ne modifient pas de façon appréciable la croissance des tissus où ils sont mis en culture. Il faut reconnaître que jusqu'ici, le titrage des virus en culture tissulaire s'est limité à quelques cas particuliers.

La découverte d'autres critères que la différence de croissance ou les changements de pH permettrait d'étendre à d'autres virus les avantages des titrages *in vitro*.

CHAPITRE VI

Production de souches utilisables comme vaccin

La production de souches atténuées en vue de la vaccination semble devoir être une des applications pratiques les plus importantes et les plus fécondes de la culture des virus *in vitro*.

Puisque cette méthode permet d'obtenir de grandes quantités de virus bactériologiquement stérile et dépourvu de protéines étrangères; puisque dans les cas favorables on peut, par des cultures sur milieux appropriés, modifier la virulence et les affinités de ce virus, il semble qu'on soit dans les meilleures conditions pour préparer une souche qui puisse servir de vaccin. De nombreuses tentatives ont été faites dans ce sens. Cependant, malgré le succès de certaines d'entre elles, l'ensemble des résultats n'a pas été aussi bon qu'on aurait pu l'espérer.

C'est ce que va montrer l'exposé rapide des principaux travaux réalisés dans ce domaine.

Après le virus vaccinal, le premier qu'on ait cultivé *in vitro* pour l'utiliser comme vaccin, et pour lequel ne se pose pas le problème de l'atténuation, nous verrons les tentatives faites sur d'autres virus pour obtenir en culture de tissus un vaccin utilisable pratiquement, et nous terminerons par la question du vaccin de culture contre la fièvre jaune.

VIRUS VACCINAL

L'idée d'utiliser la culture de tissus pour la production du virus vaccinal est ancienne. Beaucoup d'auteurs, en effet, étaient tentés par la possibilité d'obtenir du virus exempt de germes pour éviter les complications infectieuses au cours de la vaccination, et pouvoir utiliser de ce fait une voie plus sûre que la voie cutanée par

scarifications. La culture *in vitro* remplit parfaitement ce but. Mais encore fallait-il obtenir des quantités de vaccin assez importantes pour que le procédé pût être exploité. Dès 1927, Carrel et Rivers (32) aboutissent à des résultats intéressants par culture en masse sur tissus embryonnaires de poulet.

C'est à la suite de la mise au point de sa méthode de culture en milieu liquide (Li et Rivers 1930) (94), que Rivers prépare le virus en quantités suffisantes pour réaliser une véritable production de vaccin (128). Des essais sur l'animal et l'homme ont donné de bons résultats.

D'autres auteurs ont suivi cette voie. Plotz et Martin en particulier (125) utilisant à peu près la même méthode, obtiennent également des résultats qu'ils déclarent sensiblement égaux à ceux de la lymphe de génisse. Gallardo et Sanz (56) utilisent parallèlement la culture *in vitro*, la culture dans l'œuf et la filtration de la lymphe par des procédés spéciaux. Ils concluent à la valeur de ces trois procédés.

Mais les inconvénients de la méthode n'ont pas tardé à s'affirmer. Déjà en 1933 Rivers et Ward (131) signalent la diminution de la virulence en culture, nécessitant des passages sur testicule de lapin pour garder au vaccin son efficacité. C'est également ce que fait J. M. Coffey (35). Barg et Borodaj (10), constatant la faiblesse du pouvoir antigène, pensent que la méthode n'est pas encore au point, cependant que Haagen et Crodel (66) qui utilisent parallèlement la culture dans l'œuf, déclarent qu'on peut parfaitement, par l'une et l'autre méthode, maintenir la virulence à condition de s'adresser à des souches appropriées.

Par ailleurs, il ressort des études de Le Bourdellès (87) que le vaccin de culture, même exempt d'albumine, donne néanmoins lieu à des réactions d'allergie lors des revaccinations, si l'on utilise la voie intra-dermique. L'auteur ne rejette pas pour cela l'usage du vaccin de culture, mais conseille la voie cutanée par scarifications, en dehors des primo-vaccinations.

Au total, bien que les auteurs qui ont produit et utilisé le vaccin de culture s'en soient montrés satisfaits en général, il résulte de l'ensemble des travaux que la culture du virus vaccinal *in vitro* n'est pas sortie du stade expérimental. Rivers lui-même, en 1939 (132) concluait qu'il fallait, pour avoir de bons résultats, revacciner les sujets avec la lymphe 6 mois à 1 an après l'injection de vaccin de culture, l'avantage de ce dernier résidant uniquement dans la suppression des inconvénients de la primo-vaccination. Ceux-ci semblent, en fait, peu de chose en regard de la complication d'une double vaccination.

Nous conclurons donc que la production de vaccin anti-variolique au moyen de la culture de tissus est d'un intérêt théorique

certain. Cependant, même en admettant, avec les plus optimistes, que la méthode est parfaitement au point, on doit constater que pratiquement nulle part elle n'a réussi à se substituer à la production classique de la lymphé de génisse.

AUTRES VIRUS

En ce qui concerne les autres tentatives de production de vaccins en culture de tissus, nous verrons rapidement les travaux concernant les virus de :

la grippe,
la poliomyélite,
la psittacose,
la rage,
l'encéphalomyélite équine,
la peste aviaire.

Nous insisterons davantage sur le vaccin de culture contre la fièvre jaune, qui réalise le résultat le plus intéressant obtenu dans ce domaine.

a) *Grippe*. — Francis et Magill en 1937 (54) ayant cultivé le virus grippal sur milieu de Li et Rivers, utilisent la souche ainsi obtenue comme vaccin, et l'éprouvent sur 23 volontaires. Le taux des anticorps s'élève chez ces derniers et reste élevé pendant 5 mois. Les auteurs concluent que ce vaccin qui ne donne aucune réaction désagréable, doit protéger dans une certaine mesure contre la grippe.

Stokes et ses collaborateurs (159) (160), dans leurs expériences sur l'immunisation des individus au moyen de virus « actif » (c'est-à-dire capable de donner des lésions à la souris) utilisent d'abord comme vaccin une émulsion de poumons de souris, filtrée sur Berkefeld. Ils soulignent que leurs préférences iraient au vaccin cultivé sur tissus d'embryon de poulet, en raison des inconvénients de la filtration, et de l'impossibilité où l'on est de contrôler l'absence de virus étrangers. Mais la souche qu'ils ont à leur disposition ne donne pas de lésions constantes à la souris. Ulérieurement, une modification de la technique de culture leur a permis de remédier à ce défaut et le vaccin de culture a remplacé avantageusement l'émulsion de poumon virulente, car il ne donne pas de réactions locales.

Les expériences de Eaton et Beck (42) (43) ne s'adressent qu'à la souris. Elles portent sur la comparaison de différents vaccins, les uns de culture, les autres obtenus par passages sur la souris et le furet. Les souches cultivées sur tissus, tout en étant moins

virulentes, peuvent avoir un pouvoir immunisant sensiblement égal aux souches de passage sur l'animal.

Horsfall, Lennette et Rickard ont en 1941 (74) effectué une importante série d'expériences portant sur neuf vaccins d'origines différentes, dont l'un était une souche PR8 entretenue sur culture tissulaire. Les meilleurs résultats ont été obtenus par un vaccin complexe, formolé, préparé à partir d'embryon de poulet de 10 à 12 jours inoculé dans la membrane chorio-alantoïque avec le virus de la grippe A (souche passée sur souris et sur œufs) et celui de la maladie du jeune âge des chiens, et dans lequel n'intervient pas la culture de tissus.

C'est ce vaccin complexe qui a été utilisé ensuite sur une grande échelle par Dalldorf, Whitney et Ruskin (38) qui concluent qu'il pourrait rendre des services en cas de pandémie à complications sévères. Le vaccin produit en culture de tissus n'a donc pas été adopté.

Depuis a été perfectionnée la méthode de culture dans le liquide allantoïque de l'embryon de poulet [Francis, Salk, Pearson et Brown, 1944 (55)]. On peut ainsi produire en quantités importantes un vaccin très riche en virus. Sans entrer dans la discussion de la valeur du vaccin contre la grippe, avec l'apparition de nouvelles souches antigéniquement distinctes, nous concluerons que la méthode de culture de tissus a rendu des services pour l'étude de la vaccination contre la grippe, mais qu'elle n'a pas, là non plus, de grandes possibilités pratiques.

b) *Poliomyélite*. — On doit signaler la tentative de Jungeblut et Sanders (80) (81) qui, après avoir adapté une souche de virus poliomyélitique du singe (souche SK) au sigmodon, puis à la souris, la cultivent par la technique de Sanders (méthode de Maitland modifiée) sur cerveau de souris embryonnaire finement découpé en suspension dans du sérum ultrafiltré dilué.

Des inoculations intracérébrales au singe du virus cultivé *in vitro* aussi bien que de la souche passée sur cerveau de souris le protègent en partie contre la souche d'origine SK à l'exclusion des autres. Au bout d'un nombre plus élevé de passages *in vitro*, le virus perd une partie de son activité pour la souris en injection périphérique, et la protège relativement contre la souche maintenue par passages sur cerveau de souris (142).

Cette tentative de vaccination contre une souche de poliomyélite est restée sans suites pratiques.

c) *Psittacose*. — Yanamura et Meyer en 1942 (180), Morgan et Wiseman en 1946 (111), ont préparé sur culture de tissus des vaccins formolés contre la psittacose. Les premiers cultivaient le

virus sur gélose-tissu, les autres en tubes roulants. Ce dernier procédé permet, grâce à l'emploi du sérum ultrafiltré, d'obtenir un vaccin contenant un minimum de protéines étrangères. Cependant les auteurs reconnaissent qu'il est moins efficace que celui préparé à partir de virus cultivé dans le sac vitellin de l'œuf de poule (169).

d) *Rage*. — Webster et Clow (172) (173) (170) (171) ont tenté d'immuniser contre la rage au moyen d'un vaccin cultivé *in vitro*. La culture du virus rabique en milieu de Maitland, sur cerveau de souris en sérum de singe, les passages se faisant tous les 3 ou 4 jours, aboutit à une virulence uniforme. Le liquide surnageant a servi à vacciner par voie intra-péritonéale des souris, puis des chiens. Kligler et Bernkopf (84), reprenant les mêmes expériences sur la souris, préparent par la même méthode un vaccin formolé.

e) C'est également un vaccin formolé que Sanders et E. Mollay (143) produisent à partir du liquide surnageant de la culture du virus de l'*encéphalomyélite équine*, sur milieu liquide de Sanders au sérum ultrafiltré. Ils l'éprouvent sur le cobaye et le préfèrent au vaccin formolé cultivé dans l'œuf.

f) *La peste aviaire* a fait l'objet des travaux de Plotz en France et de Hallauer en Allemagne. Le premier a préparé un vaccin formolé à partir de cultures en milieu de Rivers modifié (123), le second a atténué la virulence par culture sur tissu hépatique d'embryon de poulet (68).

g) *Fièvre jaune*. — Le virus neurotrope de souris a été utilisé dès 1931 pour vacciner l'homme contre la fièvre jaune. Mais certains expérimentateurs, estimant que cette souche était trop virulente pour l'usage humain, ont cherché à en obtenir une plus atténuée. Au moyen de la culture de tissus, on a réussi à créer une nouvelle souche qui s'est révélée efficace, en même temps que sans danger. Voici le résumé de ces travaux.

Lloyd, Theiler et Ricci publient en 1936 (96) les résultats de leurs expériences sur la culture du virus de la fièvre jaune en milieu de Maitland au sérum de singe. La souche dite « Asibi », pantrope, entretenue ainsi en tissus d'embryons de souris, voit sa virulence diminuer considérablement. L'inoculation à des singes de ce virus atténué, conjointement avec un immunosérum humain, leur confère une bonne immunité. La même technique pratiquée chez l'homme provoque une forte augmentation du taux des anticorps dans le sang des patients.

Les travaux sont poursuivis par Theiler et Smith (163) Après 18 passages sur embryons de souris, le virus est cultivé en tissus d'embryons de poulet pendant 58 passages, puis en tissus d'em-

bryons de poulet privés de cerveau et de moelle épinière. La souche ainsi obtenue, appelée 17D, dérive de la souche Asibi, mais est notablement modifiée : le neurotropisme est considérablement diminué, aussi bien que le viscérotropisme, de telle sorte qu'on peut inoculer ce virus à des singes par voie sous-cutanée, sans adjonction d'immunsérum, leur conférant ainsi une solide immunité. Cette diminution de neurotropisme, fait nouveau, n'a pas pu être obtenue avec d'autres souches, malgré de nombreux essais [Smith et Theiler, 1937 (153)]. Elle ne peut donc être expliquée uniquement par la culture en milieu dépourvu de tissu nerveux (Theiler, 1948) (162).

Quoi qu'il en soit, la souche 17D a pu être employée comme vaccin chez l'homme. On a d'abord utilisé la culture elle-même. Mais il s'est avéré plus facile, pour obtenir des quantités importantes, d'utiliser l'inoculation dans l'œuf de poule. Le vaccin est donc la culture *in ovo* de la souche de virus amaril atténuée en culture de tissus. Tel quel, il a été employé sur une vaste échelle au Brésil (152). En France, dès 1936, Stefanopoulo a utilisé un vaccin cultivé dans l'œuf, à partir de la même souche 17D (155).

Les résultats ont été concluants. Malheureusement des accidents se sont produits. En dehors des réactions allergiques, c'est d'abord un retour du neurotropisme, entraînant des encéphalites chez les vaccinés, avec des cas mortels (50). En outre, on a constaté l'apparition d'ictères post-vaccinaux, fébriles, parfois graves, voire mortels (154) (51) (144). Cet accident a été évité ultérieurement lorsqu'on a supprimé le sérum humain qu'on utilisait pour diluer le vaccin, et qu'on l'a remplacé par l'eau distillée (49).

Des expériences ont été faites sur le singe pour tenter de dépister les retours éventuels de virulence (52).

Depuis, les résultats de la vaccination par la souche 17D ont été constants. On l'utilise actuellement dans de nombreux pays, en particulier en France (Institut Pasteur de Paris). Son emploi donne une élévation du taux des anticorps moindre qu'avec la souche neurotrope de souris. En revanche, les réactions générales sont moins marquées et moins nombreuses, ce qui la fait préférer pour la vaccination des enfants, des vieillards, des femmes enceintes, etc. C'est le procédé de choix pour la vaccination en masse et les primo-vaccinations en général (Stefanopoulo), la souche neurotrope pouvant être utilisée pour les vaccinations de rappel et les revaccinations.

Le rôle de la culture de tissus dans la vaccination contre la fièvre jaune a donc été capital, puisque grâce à elle on a pu obtenir une souche qui s'est révélée excellente pour la préparation de vaccins. Ce rôle s'est achevé avec l'isolement de la souche car la production du vaccin s'effectue par culture dans l'œuf.

CONCLUSION

La culture de tissus offre des conditions favorables à la production de souches de virus pouvant servir de vaccin. Mais certains inconvénients, tels que la diminution de la virulence en culture, pouvant nécessiter le retour à l'animal, et d'autre part la facilité de la culture dans l'embryon de poulet, font qu'à l'heure actuelle cette méthode n'a pas reçu d'applications pratiques étendues.

Cependant, dans un cas, et presque par hasard (Theiler), la culture de tissus a permis la création d'une souche de caractère entièrement nouveau et d'importance pratique considérable. Il s'agit de la souche 17D du virus amaril, obtenue à partir de la souche pantrope dite Asibi, qui, au cours de passages successifs *in vitro*, a vu son neurotropisme diminuer au point de devenir inoffensive pour le singe et pour l'homme, tout en gardant ses propriétés antigéniques. Ce fait a été le point de départ d'une des principales techniques de vaccination contre la fièvre jaune.

CHAPITRE VII

Etude de l'action sur les virus de substances chimiques et biologiques

La culture de tissus se prête facilement à l'étude de l'action de substances diverses sur les virus. Il suffit d'introduire dans une série de cultures le produit dont on veut étudier l'action, et dont on a au préalable établi la toxicité à l'égard du tissu envisagé.

Le titrage des virus et l'examen de l'aspect des cultures par rapport à une série-témoin permettent de tirer des conclusions précises. Cette méthode peut être utilisée seule, ou servir de complément aux autres méthodes d'étude *in vivo* et dans l'œuf.

Ce sont les méthodes en milieu liquide qui sont les plus indiquées pour ce genre d'expériences : Maitland ou Rivers, tubes roulants, membranes plastiques.

Nous distinguerons schématiquement trois cas, pour chacun desquels nous donnerons un ou deux exemples, sans que cette division ait une valeur limitative.

- Etude en culture de tissus de l'action d'un produit actif sur un virus.
- Vérification de l'inactivité d'une substance anti-bactérienne sur un virus.
- Etude systématique de l'action de différentes substances sur un virus.

1) Etude de l'action d'un produit actif sur un virus.

Gey et Bang en 1939 (61) ont complété leur travail sur la culture en tubes roulants du virus de la maladie de Nicolas-Favre (v. chapitre II) par l'étude de l'action des sulfamides.

L'introduction dans les cultures d'une solution sulfamidée, réalisant une concentration de 0,005 à 0,010 g pour 100 cm³, détermine en 48 heures la disparition presque complète des vésicules. Il y a donc une action très nette sur l'aspect cytopathologique des cultures, mais il n'est pas certain que leur virulence soit modifiée.

L'action de la pénicilline et d'autres substances sur le virus de la psittacose a fait l'objet d'une communication de Early et Morgan (1946) (41). Cette étude est effectuée en culture de tissus d'embryon de poulet (méthode des tubes roulants et de Maitland) et dans l'œuf. En 48 heures, la pénicilline, à la concentration de 5 U/cm³, fait baisser 100 fois le taux du virus titrable dans la culture en tubes roulants. Dans les mêmes conditions, la streptomycine est sans effet. Les deux antibiotiques sont sans action sur la croissance cellulaire.

Les expériences effectuées dans l'œuf confirment l'action de la pénicilline sur la croissance du virus, et l'inactivité de la streptomycine.

2) Vérification de l'inactivité d'une substance sur un virus.

La partie de l'expérience précédente qui concerne la streptomycine entre dans ce cadre. Nous y joindrons deux autres exemples.

Koprowski et Lennette (1944) (85) ont, en milieu de Maitland (embryon de poulet sans système nerveux central et sérum humain), confirmé l'absence d'action de sulfamides (sulfapyr.d.ne et sulfathiazole) sur le virus de la fièvre jaune, même à des concentrations élevées.

La même année, Parker et Diefendorf (119) ont étudié l'effet de la pénicilline sur certains virus. Cet antibiotique n'a aucune action inhibitrice sur la croissance des virus vaccinal, de l'encéphalite de Saint-Louis et de l'encéphalomyélite équine (souche Est), en milieu de Li-Rivers. Ces résultats sont confirmés par des expériences *in ovo*.

Cette faculté que possèdent la plupart des virus de résister aux antibiotiques habituels a permis leur emploi pour résoudre le problème de la purification bactériologique des virus. Nous en avons parlé à propos de l'isolement d'un agent pathogène filtrable à partir de produits pathologiques ou d'organes contaminés (chapitre V). Dès 1945, Rose, Molloy et O'Neil (133) ont utilisé la pénicilline pour éviter les contaminations bactériennes des milieux de culture liquides (type Rivers) et des œufs inoculés directement avec des crachats de malades atteints de gingivo-stomatite. Cette technique a d'ailleurs abouti à l'isolement *in ovo* d'une souche de virus herpétique.

Actuellement on emploie couramment le mélange pénicilline-streptomycine, sans action ni sur les cellules en croissance, ni sur les virus (à l'exception de ceux du groupe psittacose-lymphogranulomatose) non seulement pour purifier les virus mais pour éviter les contaminations accidentelles des cultures *in vitro*.

3) *Etude systématique de l'action de différentes substances sur un virus.*

Thompson (1947) (164) a utilisé la méthode de Maitland (tissus d'embryon de poulet et sérum de lapin) pour étudier l'action sur le virus vaccinal de métabolites, d'antagonistes de métabolites et d'inhibiteurs d'enzymes.

Une trentaine de produits ont ainsi été utilisés. Les uns inhibent la croissance du virus, les autres sont sans action sur elle ou même la stimulent. Nous n'entrerons pas dans le détail des résultats : il suffit de faire remarquer la commodité et la simplicité de la méthode de culture de tissus appliquée à de telles recherches. L'auteur souligne sa valeur particulière pour l'évaluation préalable du pouvoir que possède une substance d'influencer la croissance d'un virus.

La culture de tissus se prête d'ailleurs à toutes sortes de recherches sur les virus dans bien d'autres domaines.

A titre d'exemple signalons seulement l'étude de l'action du rayonnement ultraviolet sur le virus grippal, exécutée en 1940 par Salk, Lavin et Francis (137) : le temps d'irradiation nécessaire pour inactiver deux souches de virus A (PR8 et Melbourne) est beaucoup plus considérable si l'on s'adresse à un virus en milieu de culture de Li-Rivers (31 minutes) que pour une suspension de poumon de souris (6 minutes).

CONCLUSION

Ce court chapitre donne un aperçu du rôle que peut jouer la culture de tissus dans l'étude de l'action sur les virus d'agents très divers. Les expérimentateurs ont ainsi à leur disposition un moyen d'étude intéressant et commode, en particulier pour les problèmes concernant l'action des substances chimiothérapiques et des nouveaux antibiotiques.

CHAPITRE VIII

Culture des virus végétaux

En dehors des virus des maladies animales, les seuls que nous ayons envisagés jusqu'à présent, il existe toute une catégorie de virus responsables de maladies de plantes. Bien que la phytopathologie soit toute différente de la pathologie animale, nous dirons quelques mots de la culture de ces virus. On sait actuellement en effet cultiver *in vitro* les tissus végétaux et y entretenir la prolifération des virus correspondants.

La culture des tissus végétaux, fait paradoxal à première vue, est beaucoup plus récente que la culture des tissus animaux. De nombreux expérimentateurs l'avaient tentée depuis longtemps, mais ils se heurtaient à de sérieuses difficultés. Ce n'est qu'en 1934 que White, en Amérique, a résolu le problème, partiellement d'ailleurs. Il a pu obtenir en effet la culture indéfinie de racines isolées, ce qui constitue une culture d'« organe » plutôt que de tissu à proprement parler. Immédiatement cet auteur a utilisé cette possibilité pour la culture des virus-protéines, récemment découverts, qui avaient été reconnus parasites obligatoires des cellules végétales au même titre que les virus animaux vis-à-vis des cellules animales (174).

Il opère de la façon suivante. Des fragments de tiges de tomate atteintes de mosaïque sont placées dans une atmosphère humide, de façon à leur faire produire des racines adventives. Ce sont ces racines qui sont mises en culture : leur développement est normal. La présence du virus y est cependant démontrable, car leur broyat, inoculé à des jeunes plants de *Nicotiana glutinosa* provoque l'apparition de lésions caractéristiques. Le virus extrait de ces plantes a été identifié à celui qui avait servi à l'inoculation du début.

La répartition du virus à l'intérieur du fragment de racine a été

étudiée : ce n'est pas l'extrémité qui en contient le plus; le maximum de concentration est situé en un point distant de 9 cm du méristème apical. La propagation du virus dans les racines en culture *in vitro* est très lente.

La culture indéfinie de tissus de tiges n'a été réalisée que plus tard, simultanément en Amérique et en France (175) (58) (116). L'une de ces méthodes, la méthode de Gautheret, a été utilisée en 1943 par G. Segretain à l'Institut Pasteur de Paris (145) pour cultiver des fragments de tiges de tabac mosaïquées. Dans de telles cultures, le virus prolifère. En outre, des tissus sains de même origine ont pu être infectés avec des jus mosaïqués stérilisés par tyndalisation à basse température par l'un des deux procédés :

- Etalement du jus virulent sur l'assise génératrice mise à nu.
- Introduction du virus dans le milieu de culture.

Voici la description de la méthode de Gautheret (59).

Milieux de culture.

1) Pour prélèvements.

Milieu minéral de Knop dilué de moitié	1.000 cm ³
Gélose	13 g
Saccharose	30 g
(ou glucose)	20 g)

Suivant le végétal auquel on s'adresse, on incorporera ou non à ce milieu de l'acide indole- β -acétique (0,001 g).

2) Pour repiquages.

Même milieu que précédemment, avec en outre :	
Solution oligodynamique de Berthelot	X gouttes
Chlorhydrate de cystéine	0,01 g
Aneurine	0,001 g
Acide indole- β -acétique	0,000.01 g

Végétal.

On peut mettre en culture des fragments de racine, de tige ou de rhizome, ainsi que des tissus tumoraux.

Stérilisation du végétal.

Alors que toute la surface du végétal est exposée aux contaminations, les tissus intérieurs de la plante sont, en général, exempts de bactéries.

On stérilise superficiellement le prélèvement fait sur le végétal, soit, pour les racines et les rhizomes, par un bain de 2 à 3 heures dans une solution filtrée de chlorure de chaux, soit, pour les tiges, par un bain plus court de chlorure de chaux, suivi d'un trempage très bref dans l'alcool à 96°.

Mise en culture.

On découpe stérilement dans le végétal un fragment du tissu à cultiver, que l'on pique dans le milieu gélosé réparti en gros tubes. Une partie du fragment plonge dans le milieu, l'autre restant dans l'air confiné du tube. Le haut des tubes, bouché au coton, est recouvert de papier d'étain ou de papier sulfurisé. On place les tubes à la température d'environ 20°, à l'obscurité ou à la lumière diffuse.

Repiquages.

Les fragments mis en culture prolifèrent, soit sur la partie exposée à l'air, soit dans le milieu de culture. Au bout de deux mois environ, les néoformations sont considérables. On procède alors au repiquage en prélevant stérilement des néoformations, qui sont débarrassées du tissu superficiel, coupées en fragments de quelques millimètres et remises en cultures sur du milieu neuf.

Cette méthode de culture de tissus végétaux a servi encore à de nouvelles expériences sur les virus.

G. Segretain cultive le virus de la mosaïque du tabac dans des tissus de tiges de tabac et de tomate, sans diminution de virulence (146). Puis, par la même technique, il étudie l'action de l'urée sur le virus de la mosaïque du tabac (147) : cette substance a un fort pouvoir inactivant sur le virus en culture.

De la même façon, Mlle Augier de Montgrenier, Limasset et Morel (9) ont cultivé des fragments de tiges de tabac infectées avec un complexe virus mosaïque du tabac-virus I du concombre. Au bout d'un an de cultures, les repiquages s'effectuant tous les deux mois, l'inoculation à des plantes saines du jus de broyage fait apparaître la mosaïque, puis les déformations caractéristiques des feuilles attestant la présence du virus I du concombre. En outre, l'inoculation comparative de part et d'autre de la nervure principale avec du virus « de culture » et du virus ordinaire démontre la conservation de virulence du virus de la mosaïque.

Ces travaux sont tout récents et ne sont que le début de la série des études à accomplir sur les virus végétaux en culture de tissus, études qui permettront d'accroître les connaissances de cette catégorie de virus, qui n'est pas la moins intéressante, et peut-être de contribuer à en élucider la nature.

Conclusions générales

La culture de tissus appliquée à l'étude des virus a permis d'aboutir à des résultats qui n'ont pu jusqu'à présent être obtenus par la simple étude dans les organismes vivants.

Cette technique précieuse contribue à accroître nos connaissances sur la nature des virus, leur étude morphologique intracellulaire et la physio-pathologie des cellules parasitées.

Une notion fondamentale est pleinement confirmée par cette étude : l'impossibilité où l'on est, encore aujourd'hui, de cultiver les virus en dehors de la présence de cellules vivantes.

Cependant, quels que soient les faits observés, il faut toujours avoir présent à l'esprit qu'ils sont propres à certains virus et ne sauraient être sans contrôle l'objet de généralisations.

Cette réserve faite, on peut grouper et résumer les principaux résultats en quelques propositions.

I. — Il est possible de cultiver la plupart des virus :

- soit dans de véritables cultures de tissus,
- soit dans des suspensions de cellules vivantes ou de fragments de tissus vivants.

II. — On a constaté la possibilité d'obtenir la pullulation du virus et la formation d'inclusions spécifiques dans des cultures de tissus provenant d'organes ou d'espèces animales normalement réfractaires. Il n'est pas encore possible d'expliquer cette différence d'affinité tissulaire, d'importance théorique considérable.

III. — La technique de culture de tissus doit être adaptée au problème que l'on veut étudier à propos d'un virus donné.

Le cycle vital du virus de la maladie de Nicolas et Favre a pu être observé en totalité grâce à l'emploi de la technique de culture en tubes roulants. Celle-ci permet en effet à tout instant l'examen microscopique des cellules, ainsi qu'une durée de culture suffisamment prolongée, pour pouvoir suivre l'évolution d'un même corpuscule : sa pénétration dans la cellule, sa multiplication intense et finalement l'éclatement de la cellule, sa mort et la libération des éléments virulents.

L'examen au microscope électronique de cellules parasitées par des virus a été rendu possible par l'utilisation de la technique de culture sur membranes plastiques de polyvinyle, sur lesquelles les cellules s'étalent en couches minces transparentes aux électrons.

IV. — Appliquée à l'étude immunologique des virus, la culture de tissus a permis d'obtenir certains résultats dont les principaux sont :

Le virus ayant pénétré dans les cellules est à l'abri du sérum immun.

Le mélange virus-immunsérum peut être dissocié en culture et le virus retrouver son pouvoir pathogène.

La prolifération de certains virus est possible dans les cultures de cellules du système réticulo-endothélial.

V. — La culture de tissus se révèle dans certains cas plus sensible que l'inoculation à l'animal pour déceler de faibles doses de virus ; elle peut de ce fait servir à l'isolement d'un virus, qu'il s'agisse d'un virus déjà connu (tel celui de l'encéphalomyélite équine américaine) ou d'un virus non encore identifié (tel celui de la kérato-conjonctivite épidémique).

VI. — La préparation de vaccins par la méthode de culture de tissus est d'intérêt surtout théorique. Cependant, au moins dans le cas de la fièvre jaune, cette méthode a permis d'obtenir une souche atténuée, origine d'un vaccin d'importance pratique considérable.

VII. — La culture de tissus se prête particulièrement à l'étude de l'action sur les virus de substances diverses, en particulier des antibiotiques.

VIII. — La possibilité d'étendre aux virus des végétaux les principes directeurs de l'étude en culture de tissus des virus des maladies animales est en faveur de l'analogie de développement et de multiplication intra-cellulaire des virus de ces deux règnes.

Vu : *Le Doyen,*
pour le Doyen, l'Assesseur,
J. VERNE.

Vu : *Le Président de Thèse,*
P. MOLLARET.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur,
SARRAILH.

Bibliographie

1. — AKAZAKI (K.), *Arch. exper. Zellforsch.*, 1937, 20, 89.
2. — ANDREWES (C. H.), *Brit. J. exp. Path.*, 1929, 10, 188.
3. — ANDREWES (C. H.), *Brit. J. exp. Path.*, 1929, 10, 273.
4. — ANDREWES (C. H.), *Brit. J. exp. Path.*, 1930, 11, 23.
5. — ANDREWES (C. H.), *J. Path. Bact.*, 1930, 33, 301.
6. — ANDREWES (C. H.), *J. Path. Bact.*, 1940, 50, 227.
7. — ANDREWES (C. H.), *Brit. J. exp. Path.*, 1942, 23, 214.
8. — ANDREWES (C. H.) et ELFORD (W. J.), *Brit. J. exp. Path.*, 1947, 28, 278.
9. — AUGIER DE MONTGREMIER (Mlle H.), LIMASSET (P.) et MOREL (G.), *C. R. Acad. Sci.*, 1948, 227, 606.
10. — BARG (G. S.) et BORODAJ (W. M.), *Acta med. scand.*, 1936, 89, 180.
11. — BARSKI (G.) et MAURIN (J.), *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, 74, 312.
12. — BARSKI (G.), MAURIN (J.) et CROISSANT (Mlle O.), *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, 76, 1.
13. — BARSKI (G.), MAURIN (J.) et LÉPINE (P.), *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, 76, 221.
14. — BEARD (J. W.) et ROUS (Peyton), *J. exp. Med.*, 1938, 67, 883.
15. — BEDSON (S. P.) et BLAND (J. O. W.), *Brit. J. exp. Path.*, 1932, 13, 461.
16. — BEDSON (S. P.) et BLAND (J. O. W.), *Brit. J. exp. Path.*, 1934, 15, 243.
17. — BLAND (J. O. W.) et CANTI (R. G.), *J. Path. Bact.*, 1935, 40, 231.
18. — BLAND (J. O. W.) et ROBINOW (C. F.), *Arch. exper. Zellforsch.*, 1938, 22, 453.
19. — BLAND (J. O. W.) et ROBINOW (C. F.), *J. Path. Bact.*, 1939, 48, 381.
20. — BORREL (A.), *Bull. Ass. franç. Etude Cancer*, 1927, 16, 115.
21. — BROADHURST (J.), CAMERON (G.), MACLEAN (M. E.) et SAURINO (V.), *J. inf. Dis.*, 1939, 64, 193.
22. — BROADHURST (J.), CAMERON (G.) et SAURINO (V.), *J. inf. Dis.*, 1938, 62, 6.
23. — BURNETT (F. M.) et ROUNTREE (P. M.), *J. Path. Bact.*, 1935, 40, 471.
24. — BURROWS (M. T.), *J. A. M. A.*, 1910, 55, 2057.
25. — BURROWS (M. T.), *C. R. Soc. Biol.*, 1910, 69, 291.

26. — CARREL (A.), *Berl. Klin. Wochenschr.*, 1913, 50, 1097.
27. — CARREL (A.) in T. M. RIVERS, *Filterable Virus*, Williams et Wilkins, Baltimore, 1928, p. 97.
28. — CARREL (A.) et BURROWS (M. T.), *C. R. Soc. Biol.*, 1910, 69, 293.
29. — CARREL (A.) et BURROWS (M. T.), *J. A. M. A.*, 1910, 55, 1379.
30. — CARREL (A.) et BURROWS (M. T.), *J. A. M. A.*, 1910, 55, 1554.
31. — CARREL (A.) et INGEBRIGTSEN (R.), *C. R. Soc. Biol.*, 1912, 72, 220.
32. — CARREL (A.) et RIVERS (T. M.), *C. R. Soc. Biol.*, 1927, 96, 848.
33. — CHEEVER (F. S.), *P. S. E. B. M.*, 1939, 42, 113.
34. — CLAUDE (A.), PORTER (K. R.) et PICKELS (E. G.), *Cancer Res.*, 1947, 7, 421.
35. — COFFEY (J. M.), *Am. J. Publ. Health*, 1934, 24, 473.
36. — COX (H. R.), *P. S. E. B. M.*, 1935-36, 33, 607.
37. — CURTH (W.), CURTH (H. OLENDORFF-) et SANDERS (M.), *J. A. M. A.*, 1940, 115, 445.
38. — DALLDORF (G.), WHITNEY (E.) et RUSKIN (A.), *J. A. M. A.*, 1941, 116, 2574.
39. — DOWNIE (A. W.) et MCGAUGHEY (C. A.), *J. Path. Bact.*, 1935, 40, 147.
40. — DOWNIE (A. W.) et MCGAUGHEY (C. A.), *J. Path. Bact.*, 1935, 40, 297.
41. — EARLY (R. L.) et MORGAN (H. R.), *J. Immunol.*, 1946, 53, 151.
42. — EATON (M. D.), *J. Immunol.*, 1940, 39, 43.
43. — EATON (M. D.) et BECK (M. D.), *J. Immunol.*, 1940, 39, 57.
44. — ENDERS (J. F.) et PEARSON (H. E.), *P. S. E. B. M.*, 1941, 48, 143.
45. — FELLER (A. E.), ENDERS (J. F.) et WELLER (T. H.), *J. exp. Med.*, 1940, 72, 367.
46. — FINDLAY (G. M.) et MACCALLUM (F. O.), *J. Path. Bact.*, 1937, 44, 405.
47. — FISCHER (A.), *Zeitschr. Krebsforsch.*, 1927, 24, 580.
48. — FLORMAN (A. L.) et ENDERS (J. F.), *J. Immunol.*, 1942, 43, 159.
49. — FOX (J. P.), KOSSOBUDZKI (S. L.) et FONSECA DA CUNHA (J.), *Am. J. Hyg.*, 1943, 38, 113.
50. — FOX (J. P.), LENNETTE (E. H.), MANSO (C.) et SOUZA AGUIAR (J. R.), *Am. J. Hyg.*, 1942, 36, 117.
51. — FOX (J. P.), MANSO (C.), PENNA (H. A.) et PARA (M.), *Am. J. Hyg.*, 1942, 36, 68.
52. — FOX (J. P.) et PENNA (H. A.), *Am. J. Hyg.*, 1943, 38, 152.
53. — FRANCIS (T., Jr) et MAGILL (T. P.), *P. S. E. B. M.*, 1937, 36, 134.
54. — FRANCIS (T., Jr) et MAGILL (T. P.), *J. exp. Med.*, 1937, 65, 251.
55. — FRANCIS (T., Jr), SALK (J. E.), PEARSON (H. E.) et BROWN (P. N.), *P. S. E. B. M.*, 1944, 55, 104.
56. — GALLARDO (E.) et SANZ (J.), *Am. J. Hyg.*, 1937, 25, 354.
57. — GALLI (F.), *Boll. Ist. sieroter. Milan.*, 1937, 16, 482.
58. — GAUTHERET (R.), *C. R. Acad. Sci.*, 1939, 208, 118.
59. — GAUTHERET (R. J.), *Manuel technique de culture des tissus végétaux*, Masson et Cie, Paris, 1942.
60. — GEY (G. O.), *Am. J. Cancer*, 1933, 17, 752.
61. — GEY (G. O.) et BANG (F. B.), *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1939, 65, 393.

62. — GOODPASTURE (E. W.) et TEAGUE (O.), *J. med. Res.*, 1923-24, 44, 121.
63. — GRAND (C. G.), *P. S. E. B. M.*, 1944, 56, 229.
64. — HAAGEN (E.), *Zentralbl. Bakt.* I, 1933, 128, 13.
65. — HAAGEN (E.), *Zentralbl. Bakt.* I, 1933, 129, 237.
66. — HAAGEN (E.) et CRODEL (B.), *Zentralbl. Bakt.* I, 1937, 138, 20 et 27.
67. — HAAGEN (E.) et KODAMA (N.), *Arch. exper. Zellforsch.*, 1937, 19, 421.
68. — HALLAUER (C.), *Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr.*, 1934-35, 116, 456.
69. — HARDE (Edna STEINHARDT-), *Ann. Inst. Pasteur*, 1916, 30, 299.
70. — HARRISON (R. G.), *P. S. E. B. M.*, 1906-1907, 4, 140.
71. — HARRISON (R. G.), *J. exp. Zoölogie*, 1910, 9, 787.
72. — HENLE (W.) et HENLE (G.), *Science*, 1943, 98, 87.
73. — HENLE (W.) et HENLE (G.), *Am. J. med. Sci.*, 1944, 207, 705 et 717.
74. — HORSFALL (F. L., Jr), LENNETTE (E. H.) et RICKARD (E. R.), *J. exp. Med.*, 1941, 73, 335.
75. — HOSKINS (M.), *Am. J. trop. Med.*, 1935, 15, 675.
76. — HUANG (C. H.), *P. S. E. B. M.*, 1942, 51, 396.
77. — HUANG (C. H.), *J. exp. Med.*, 1943, 78, 111.
78. — HUANG (C. H.), *P. S. E. B. M.*, 1943, 54, 158.
79. — HUANG (C. H.), *P. S. E. B. M.*, 1943, 54, 160.
80. — JUNGBLUT (C. W.) et SANDERS (M.), *P. S. E. B. M.*, 1940, 44, 375.
81. — JUNGBLUT (C. W.) et SANDERS (M.), *J. exp. Med.*, 1940, 72, 407.
82. — KAWAKITA (Y.), *Jap. J. exp. Med.*, 1939, 17, 211.
83. — KIMURA (R.) et FUJISAWA (Y.), *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, 1932, 74, 384.
84. — KLIGLER (I. J.) et BERNKOPF (H.), *Brit. J. exp. Path.*, 1938, 19, 378.
85. — KOPROWSKI (H.) et LENNETTE (E. H.), *Am. J. Hyg.*, 1944, 40, 1.
86. — KUROCHKIN (T. J.), *P. S. E. B. M.*, 1939, 41, 407.
87. — LE BOURDELLÈS (B.), *C. R. Soc. Biol.*, 1939, 130, 533.
88. — LENNETTE (E. H.) et KOPROWSKI (H.), *J. exp. Med.*, 1946, 83, 195.
89. — LEVADITI (C.), *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, 1179.
90. — LEVADITI (C.), *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 75, 202.
91. — LEVADITI (C.), *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 75, 505.
92. — LEVADITI (C.), HARVIER (P.) et NICOLAU (S.), *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 84, 524.
93. — LEVINTHAL (W.), *Lancet*, 1935, 228, 1207.
94. — LI (C. P.) et RIVERS (T. M.), *J. exp. Med.*, 1930, 52, 465.
95. — LIPSCHÜTZ (B.), *Arch. Dermatol. u. Syphil.*, 1921, 136, 428.
96. — LLOYD (W.), THEILER (M.) et RICCI (N. I.), *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1935-36, 29, 481.
97. — LOEWENSTAEDT (H.), *Arch. exper. Zellforsch.*, 1925, 1, 251.
98. — MAGILL (T. P.) et FRANCIS (T., Jr), *J. exp. Med.*, 1937, 65, 861.
99. — MAGNUS (P. von), *Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi*, 1946, 24 B, n° 7.
100. — MAGRASSI (F.), *Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr.*, 1935-36, 117, 573.
101. — MAGRASSI (F.), *Giorn. Batt. e Immun.*, 1936, 16, 769.
102. — MAGRASSI (F.) et HALLAUER (C.), *Giorn. Batt. e Immun.*, 1936, 17, 737.
103. — MAITLAND (H. B.) et MAITLAND (M. C.), *Lancet*, 1928, 215, 596.

104. — MALAMOS (B.), *Zentralbl. Bakt. I*, 1937, 140, 164 *.
105. — MALAMOS (B.), *Zentralbl. Bakt. I*, 1938-39, 143, 1.
106. — MANABE (K.), *Jap. J. exp. Med.*, 1939, 17, 333 et 355.
107. — MAXIMOW (A.), *Ann. Inst. Pasteur*, 1928, 42, 225.
108. — MCKINNEY (H. H.), *J. agric. Research*, 1929, 39, 557.
109. — MERLING (K. B. EISENBERG-), *J. Path. Bact.*, 1940, 50, 279.
110. — MIYAGAWA (Y.), MITAMURA (T.), YAOI (H.), ISHII (N.), OKANISHI (J.), GOTO (T.) et SHIMIZU (S.), *Jap. J. exp. Med.*, 1936, 14, 207.
111. — MORGAN (H. R.) et WISEMAN (R. W.), *J. infect. Dis.*, 1946, 79, 131.
112. — NAUCK (E. G.), *Arch. exper. Zellforsch.*, 1936, 18, 336.
113. — NAUCK (E. G.), *Arch. Schiffs- u. Tropenhyg.*, 1937, 41, 748.
114. — NAUCK (E. G.) et ROBINOW (C.), *Zentralbl. Bakt. I*, 1935-36, 135, 437.
115. — NIGG (C.), WILSON (D. E.) et CROWLEY (J. H.), *Am. J. Hyg.*, 1941, 34, 138.
116. — NOBÉCOURT (P.), *C. R. Soc. Biol.*, 1939, 130, 1270.
117. — NYE (R. N.) et PARKER (F., Jr) *Am. J. Path.*, 1929, 5, 147.
118. — PANG (K. H.) et ZIA (S. H.), *Chinese med. J.*, 1940, supp. III, 446.
119. — PARKER (R. F.) et DIEFENDORF (H. W.), *P. S. E. B. M.*, 1944, 57, 351.
120. — PARKER (R. F.) et RIVERS (T. M.), *J. exp. Med.*, 1935, 62, 65.
121. — PEARCE (J. M.), *J. Immunol.*, 1940, 38, 9.
122. — PEARSON (H. E.) et ENDERS (J. F.), *P. S. E. B. M.*, 1941, 48, 140.
123. — PLOTZ (H.), *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 115, 357.
124. — PLOTZ (H.), *Bull. Acad. Méd.*, 1938, 119, 598.
125. — PLOTZ (H.) et MARTIN (R.), *Bull. Acad. Méd.*, 1936, 116, 454.
126. — PORTER (K. R.), CLAUDE (A.) et FULLAM (E. F.), *J. exp. Med.*, 1945, 81, 233.
127. — RAKE (G.), SHAFFER (M. F.) et JONES (H. P.), *J. inf. Dis.*, 1941, 69, 65.
128. — RIVERS (T. M.), *J. exp. Med.*, 1931, 54, 453.
129. — RIVERS (T. M.), HAAGEN (E.) et MUCKENFUSS (R. S.), *J. exp. Med.*, 1929, 50, 665.
130. — RIVERS (T. M.), HAAGEN (E.) et MUCKENFUSS (R. S.), *J. exp. Med.*, 1929, 50, 673.
131. — RIVERS (T. M.) et WARD (S. M.), *J. exp. Med.*, 1933, 58, 635.
132. — RIVERS (T. M.), WARD (S. M.) et BAIRD (R. D.), *J. exp. Med.*, 1939, 69, 857.
133. — ROSE (H. M.), MOLLOY (E.) et O'NEILL (E.), *P. S. E. B. M.*, 1945, 60, 23.
134. — ROUS (Peyton), McMASTER (P. D.) et HUDACK (S. S.), *P. S. E. B. M.*, 1933-34, 31, 90.
135. — ROUS (Peyton), McMASTER (P. D.) et HUDACK (S. S.), *J. exp. Med.*, 1935, 61, 657.
136. — SABIN (A. B.), *Brit. J. exp. Path.*, 1935, 16, 84.
137. — SALK (J. E.), LAVIN (G. I.) et FRANCIS (T., Jr), *J. exp. Med.*, 1940, 72, 729.
138. — SANDERS (M.), *J. exp. Med.*, 1940, 71, 113.
139. — SANDERS (M.), *Arch. Ophth.*, 1942, 28, 581.
140. — SANDERS (M.) et HUANG (C. H.), *Am. J. Publ. Health*, 1944, 34, 461.

141. — SANDERS (M.), HUANG (C. H.) et SIMMS (H. S.), *J. Bact.*, 1943, 45, 81.
142. — SANDERS (M.) et JUNGBLUT (C. W.), *J. exp. Med.*, 1942, 75, 631.
143. — SANDERS (M.) et MOLLOY (E.), *P. S. E. B. M.*, 1940, 45, 327.
144. — SAWYER (W. A.), MEYER (K. F.), EATON (M. D.), BAUER (J. H.), PUTNAM (P.) et SCHWENTKER (F. F.), *Am. J. Hyg.*, 1944, 40, 35.
145. — SEGRETAINE (G.), *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, 69, 61.
146. — SEGRETAINE (G.), *C. R. Acad. Sci.*, 1948, 226, 594.
147. — SEGRETAINE (G.), *Rev. de Path. vég. et d'Entomol. agric. de Fr.*, 1948, 27, 98.
148. — SIMMS (H. S.), *Science*, 1936, 83, 418.
149. — SIMMS (H. S.) et SANDERS (M.), *Arch. Path.*, 1942, 33, 619.
150. — SIMMS (H. S.) et STILLMANN (N. P.), *J. gen. Physiol.*, 1937, 20, 649.
151. — SMADELL (J. E.) et WALL (M. J.), *J. exp. Med.*, 1937, 66, 325.
152. — SMITH (H. H.), PENNA (H. A.) et PAOLIELLO (A.), *Am. J. trop. Med.*, 1938, 18, 437.
153. — SMITH (H. H.) et THEILER (M.), *J. exp. Med.*, 1937, 65, 801.
154. — STEFANOPOULO (G. J.), *Acta Conventus tertii de tropicis Morbis*, Amsterdam, 1938, 1, 319.
155. — STEFANOPOULO (G. J.) et DUVOLON (Mlle S.), *Bull. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1947, 32-33, 990.
156. — STEINHARDT (E.), ISRAELI (C.) et LAMBERT (R. A.), *J. inf. Dis.*, 1913, 13, 294.
157. — STEINHARDT (E.) et LAMBERT (R. A.), *J. inf. Dis.*, 1914, 14, 87.
158. — STOEL (G.), *Arch. exper. Zellforsch.*, 1931, 10, 452.
159. — STOKES (J., Jr), CHENOWETH (A. D.), WALTZ (A. D.), GLADEN (G.) et SHAW (D.), *J. clin. Invest.*, 1937, 16, 237.
160. — STOKES (J., Jr), MCGUINNESS (A. C.) LANGNER (P. H., Jr) et SHAW (D.), *Am. J. med. Sci.*, 1937, 194, 757.
161. — TENBROECK (C.), *J. exp. Med.*, 1941, 74, 427.
162. — THEILER (M.) in T. M. RIVERS, *Virial and Rickettsial infections of man*, J. B. Lippincott Company, Philadelphie, 1948, p. 429.
163. — THEILER (M.) et SMITH (H. H.), *J. exp. Med.*, 1937, 65, 767 et 787.
164. — THOMPSON (R. L.), *J. Immunol.*, 1947, 55, 345.
165. — TOPACIO (T.) et HYDE (R. R.), *Am. J. Hyg.*, 1932, 15, 99.
166. — TRAUB (E.), *J. exp. Med.*, 1935, 61, 833.
167. — VIEUCHANGE (J.) et STAMATIN (L.), *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 128, 904.
168. — VIEUCHANGE (J.) et STAMATIN (L.), *C. R. Soc. Biol.*, 1939, 132, 426.
169. — WAGNER (J. C.), MEIKLEJOHN (G.), KINGSLAND (L. C.) et HICKISH (H. W.), *J. Immunol.*, 1946, 54, 35.
170. — WEBSTER (L. T.), *New Engl. J. Med.*, 1937, 217, 687.
171. — WEBSTER (L. T.), *Am. J. Publ. Health*, 1938, 28, 44.
172. — WEBSTER (L. T.) et CLOW (A. D.), *Science*, 1936, 84, 487.
173. — WEBSTER (L. T.) et CLOW (A. D.), *J. exp. Med.*, 1937, 66, 125.
174. — WHITE (P. R.), *Phytopath.*, 1934, 24, 1003.
175. — WHITE (P. R.), *Am. J. Bot.*, 1939, 26, 59.
176. — WIRTH (J.), *C. R. Acad. Sci.*, 1947, 225, 899.
177. — WIRTH (J.), ATANASIU (P.), BARSKI (G.) et CROISSANT (Mlle O.), *C. R. Acad. Sci.*, 1947, 225, 827.
178. — WIRTH (J.) et BARSKI (G.), *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, 73, 987.
179. — YANAMURA (H. Y.) et MEYER (K. F.), *J. infect. Dis.*, 1941, 68, 1.

180. — YANAMURA (H. Y.) et MEYER (K. F.), *J. Immunol.*, 1942, 44, 195.
181. — ZIA (S. H.), LIU (P. Y.) et PANG (K. H.), *Chinese Med. J.*, 1938, 54, 547.
182. — ZINSSER (H.), WEI (H.) et FITZPATRICK (Fl.), *P. S. E. B. M.* 1937-38, 37, 604.
183. — ZINSSER (H.), WEI (H.) et FITZPATRICK (Fl.), *P. S. E. B. M.*, 1938, 38, 285.

TABLE DES MATIERES

Introduction	9
CHAPITRE PREMIER. — Exposé général des Techniques de Culture	11
CHAPITRE II. — Comportement des virus en culture de tissus et lésions histologiques qu'ils provoquent	25
CHAPITRE III. — Etudes immunologiques	51
CHAPITRE IV. — Etude des interférences entre deux virus ..	65
CHAPITRE V. — Isolement et titrages des virus	71
CHAPITRE VI. — Production de souches utilisables comme vaccin	79
CHAPITRE VII. — Etude de l'action sur les virus de substances chimiques et biologiques	87
CHAPITRE VIII. — Culture des virus végétaux	91
Conclusions générales	95
Bibliographie	97

J. PEYRONNET & Cie, EDITEURS

33, Rue Vivienne, 33

1950

